

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Katrin Hartmann

**Charakterisierung des endoskopischen und  
histologischen Bildes sowie der mikrobiellen  
Besiedelung des Darmes von Hunden mit akuter  
hämorrhagischer Diarrhoe**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Kathrin Busch

aus Pfullingen

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion: 9. Februar 2013

Für meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Definition .....	2
1.2.	Ätiologie.....	2
1.3.	Klinische Symptome und Laborveränderungen .....	4
1.4.	Histologische Veränderungen der Darmwand .....	4
<b>2.</b>	<b>Darmpathogene Clostridien .....</b>	<b>5</b>
2.1.	<i>Clostridium perfringens</i> .....	5
2.1.1.	Toxovare von <i>Clostridium perfringens</i> .....	6
2.1.1.1.	<i>Clostridium perfringens</i> Typ A .....	6
2.1.1.2.	<i>Clostridium perfringens</i> Typ B .....	7
2.1.1.3.	<i>Clostridium perfringens</i> Typ C .....	8
2.1.1.4.	<i>Clostridium perfringens</i> Typ D .....	9
2.1.1.5.	<i>Clostridium perfringens</i> Typ E.....	9
2.1.2.	Toxine .....	9
2.1.2.1.	Alpha-Toxin .....	10
2.1.2.2.	Beta-Toxine .....	10
2.1.2.3.	Epsilon-Toxin.....	11
2.1.2.4.	Jota-Toxin .....	11
2.1.2.5.	Enterotoxin .....	11
2.1.3.	Vorkommen bei Hunden.....	13
2.1.3.1.	Nachweismethoden.....	13
2.1.3.1.1.	Bakteriennachweis.....	14
2.1.3.1.2.	Quantifizierung der Endosporen.....	14
2.1.3.1.3.	Toxinnachweis.....	14
2.1.3.1.4.	Nachweis des Toxingens.....	14
2.1.3.2.	Therapieoptionen .....	15
2.2.	<i>Clostridium difficile</i> .....	15
2.2.1.	Toxine .....	16
2.2.2.	Vorkommen bei Hunden.....	17
2.2.2.1.	Nachweismethoden.....	18

2.2.2.1.1.	Bakteriennachweis .....	18
2.2.2.1.2.	Toxinnachweis.....	18
2.2.2.1.3.	Nachweis des Toxingens.....	19
2.2.2.2.	Therapieoptionen .....	19
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>1.</b>	<b>Endoskopiестudie .....</b>	<b>20</b>
1.1.	Tiere .....	20
1.1.1.	Patienten.....	20
1.1.1.1.	Einschlusskriterien.....	20
1.1.1.2.	Ausschlusskriterien.....	20
1.1.2.	Kontrollgruppe .....	22
1.2.	Untersuchungen.....	22
1.2.1.	Anamnese .....	23
1.2.2.	Klinische Untersuchung.....	23
1.2.3.	Krankheitsaktivitätsindex.....	23
1.2.4.	Blutuntersuchungen .....	24
1.2.5.	Endoskopie .....	24
1.2.5.1.	Makroskopische Beurteilung.....	25
1.2.5.2.	Biopsieentnahme .....	25
1.2.5.3.	Bakteriologische Untersuchungen.....	25
1.2.5.3.1.	Bakterienkultivierung .....	25
1.2.5.3.2.	Quantifizierung des Bakterienwachstums.....	26
1.2.5.4.	Differenzierung der Bakterien mittels Massenspektrometrie .....	26
1.2.5.5.	Typisierung der Clostridien mittels Polymerase Chain Reaction .....	27
1.2.6.	Histologische Untersuchung .....	27
1.2.6.1.	Bearbeitung der Proben für die histologische Beurteilung .....	28
1.2.6.2.	Histologische Beurteilung .....	29
1.2.6.3.	Immunhistologie für <i>Clostridium perfringens</i> .....	29
1.2.6.4.	Immunhistologie auf Parvovirose.....	30
<b>2.</b>	<b>Nachweis von Clostridientoxinen und für Toxin codierende Gene.....</b>	<b>31</b>
2.1.	Tiere .....	31
2.1.1.	Patienten.....	31
2.1.1.1.	Einschlusskriterien.....	31
2.1.1.2.	Ausschlusskriterien.....	31

2.1.2.	Kontrollgruppe .....	33
2.2.	Untersuchungen .....	33
2.2.1.	Anamnese .....	33
2.2.2.	Klinische Untersuchung .....	33
2.2.3.	Krankheitsaktivitätsindex .....	34
2.2.4.	Blutuntersuchungen .....	34
2.3.	Nachweis von Toxinen und toxintragenden Genen im Kot .....	34
2.3.1.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay für Toxinnachweis .....	34
2.3.2.	Quantitative Polymerase Chain Reaction für Gennachweis .....	35
2.3.2.1.	<i>Clostridium-perfringens</i> -Enterotoxinen .....	36
2.3.2.2.	Gen für Toxin B .....	36
<b>3.</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>36</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>1.</b>	<b>Endoskopiestudie .....</b>	<b>37</b>
1.1.	Signalement .....	37
1.1.1.	Studienteilnehmer .....	37
1.1.2.	Kontrolltiere .....	37
1.2.	Anamnese .....	38
1.3.	Klinische Untersuchung .....	39
1.4.	Krankheitsaktivitätsindex und Dauer des Aufenthaltes .....	39
1.5.	Laborparameter .....	42
1.5.1.	Blutuntersuchungen .....	42
1.5.1.1.	Blutbild .....	42
1.5.1.2.	Serumprofil .....	42
1.5.2.	Bakteriologische Untersuchungen .....	45
1.5.2.1.	Studienteilnehmer .....	45
1.5.2.2.	Kontrolltiere .....	45
1.5.3.	Serotypisierung .....	45
1.6.	Endoskopie .....	48
1.6.1.	Ösophagus .....	48
1.6.2.	Magen .....	48
1.6.3.	Duodenum .....	49
1.6.4.	Ileum .....	50
1.6.5.	Kolon .....	51

1.7.	Histologische Veränderungen .....	52
1.7.1.	Magen .....	52
1.7.2.	Duodenum.....	55
1.7.3.	Ileum .....	57
1.7.4.	Kolon .....	61
1.8.	Vergleich der Schwere der Veränderungen zwischen den einzelnen Lokalisationen .....	62
1.9.	Histologischer Nachweis von Bakterien.....	64
1.10.	Immunhistologischer Nachweis von <i>Clostridium</i> spp.....	64
1.10.1.	Übersicht Bakteriennachweis .....	67
<b>2.</b>	<b>Toxinstudie.....</b>	<b>69</b>
2.1.	Signalement und Anamnese .....	69
2.2.	Laborparameter.....	69
2.3.	Kotuntersuchungen .....	70
2.4.	Vergleich positiv und negativ getesteter Tiere.....	71
2.4.1.	Toxinnachweis.....	71
2.4.2.	Gennachweis .....	71
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>88</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>110</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>124</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ADT	Adenosin-Diphosphat-Ribosyltransferase
AHDS	akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ca.	circa
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
cpa	für Alpha-Toxin codierendes Gen
CPE	<i>C.-perfringens</i> -Enterotoxin
cpe	für CPE codierendes Gen
CTA	culture cytotoxicity assay
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, antikörperbasiertes Nachweisverfahren
engl.	englisch
Gr.	Granulozyten
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
kDa	Kilodalton
KFZ	kapilläre Füllungszeit
kg	Kilogramm
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians Universität
m	männlich
mg	Milligramm
mgr.	mittelgradig
min	Minute
mk	männlich kastriert
mmol	Millimol
MW	Mittelwert
nM	Nanomol
Nr.	Nummer
NSAID	nichtsteroidales Antiphlogistikum
p. o.	per os
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pH	Pondus hydrogenii
Prof.	Professor
RPLA	reverse passive latex agglutination assay, reverser Latex-Agglutinationstest
s	Sekunde
s. c.	sub cutan
SD	Standardabweichung
SGS	Serumgallensäuren
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
stabk.	stabkernig
TBS	Tris Buffer Saline



TcdB	für Toxin B von <i>C. difficile</i> codierendes Gen
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association
z. T.	zum Teil

## I. EINLEITUNG

Akut einsetzender blutiger Durchfall, der oft ohne erkennbare Ursache und z. T. mit blutigem Erbrechen einhergeht, ist ein Krankheitsgeschehen bei Hunden, welches zwar schon lange bekannt ist, dessen Ätiologie jedoch immer noch nicht hinreichend geklärt ist. Das ursprünglich von HILL 1972 als „canine intestinal hemorrhage syndrome“ benannte Krankheitsbild wird im deutschen Sprachgebrauch häufig als „hämorrhagische Gastroenteritis“ (engl. „hemorrhagic gastroenteritis“) bezeichnet, ohne dass jedoch der Nachweis des implizierten Entzündungsgeschehens in Magen und Darm erbracht wurde. Über die Pathogenese dieser Erkrankung ist nach wie vor wenig bekannt. Histologische Veränderungen wurden bisher nur nach Obduktion an verstorbenen Tieren beschrieben. Die gefundenen Veränderungen des Magendarmtraktes sind jedoch durch schnell fortschreitende Autolyse schwer zu beurteilen. Ebenso ist es schwierig, die im Dünndarm vorgefundenen Bakterien als Beteiligte am Krankheitsgeschehen zu identifizieren, da *post mortem*, durch fehlende Peristaltik und geöffnete Sphinkteren, schnell Bakterien aus dem Dickdarm aufsteigen und den Dünndarm sekundär überwuchern können.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie, zum einen zehn an akutem blutigem Durchfall erkrankte Hunde während des Krankheitsgeschehens zu endoskopieren und zum anderen, den Kot von 54 erkrankten Hunden auf Toxine und Toxin tragende Gene zu untersuchen. Die Ziele der Endoskopiestudie waren die Beschreibung von Verteilung, Art und Schweregrad der endoskopischen und histologischen Veränderungen im Magendarmtrakt und der Nachweis von *Clostridium* spp. mittels Histologie, Immunhistologie und Kultur im Dünndarm. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde anhand einer größeren Patienten- und Kontrollgruppe untersucht, wie häufig Enterotoxin codierende *Clostridium-perfringens*-Stämme (*C. perfringens*) und Toxin-B-codierende *Clostridium-difficile*-Stämme (*C. difficile*), sowie deren Toxine *C.-perfringens*-Enterotoxin (CPE) und Toxin B bei Hunden mit akutem hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom (AHDS) und bei gesunden Kontrolltieren vorkommen und ob zwischen AHDS Patienten mit positivem und negativem Nachweis von Clostridientoxinen im Kot Unterschiede hinsichtlich der Klinik und Laborveränderungen vorliegen.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom

Der Begriff „akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom“ (AHDS) ist eine Bezeichnung, die sich an den im amerikanischen Sprachgebrauch üblichen Namen „canine intestinal hemorrhage syndrome“ anlehnt (HILL, 1972). Ganz bewusst wurde jedoch in dieser Arbeit auf den im Deutschen häufig verwendeten Begriff „Hämorrhagische Gastroenteritis“, kurz auch als „HGE“ bezeichnet, verzichtet.

#### 1.1. Definition

Beim AHDS handelt es sich um eine Erkrankung, die durch akut einsetzenden blutigen Durchfall, mit oder ohne Erbrechen, gekennzeichnet ist. Als Charakteristikum wird zusätzlich eine deutliche Hämokonzentration angesehen (BURROWS, 1977). Erstmals erwähnt wurde das AHDS 1972 bei HILL, welcher dieses Krankheitsbild als „canine intestinal hemorrhage syndrome“ bezeichnete (HILL, 1972). Es ist besonders bei jungen, über einem Jahr alten Hunden kleiner Rassen beschrieben. In einer Studie waren vor allem Miniaturschnauzer, Miniatur- und Toypudel überrepräsentiert (BURROWS, 1977).

#### 1.2. Ätiologie

Schon seit vielen Jahren wird über die möglichen Ursachen für die Entstehung des AHDS diskutiert. In Betracht gezogen wurden Immunreaktionen, wie anaphylaktische Reaktionen und Futtermittelallergien, ebenso wie eine Beteiligung von Bakterientoxinen (HILL, 1972; BAKER, 1974; BURROWS, 1977; SPIELMAN, 1993).

HILL erkannte 1972 eine Ähnlichkeit zu anaphylaktischen Reaktionen, beispielsweise ausgelöst durch Endotoxämien, welche durch gramnegative Keime hervorgerufen werden können. Die dadurch entstehende Aktivierung von Entzündungsmediatoren kann zu einer generalisierten Hypotension, Hypoxie und Ödematisierung des Darmes führen. Diese Reaktion wiederum kann mittels Enzymaktivierung eine Autodigestion hervorrufen (BOUNOUS et al., 1964). Die hierdurch ausgelösten Symptome entsprechen denen eines AHDS. Die häufig beobachtete Hämokonzentration ließe sich damit jedoch nicht erklären. Zudem

haben Hunde mit AHDS für gewöhnlich keine Thrombozytopenie, die bei einer durch die anaphylaktische Reaktion hervorgerufenen disseminierten intravasalen Gerinnung üblicherweise beobachtet wird (SPIELMAN, 1993).

Eine andere Theorie weist auf gewisse Parallelen zwischen dem klinischen Verlauf einer akuten Futtermittelallergie und einem AHDS hin (HILL, 1972; BAKER, 1974; BURROWS, 1977). Allerdings traten Futtermittelallergiker in der Studie von BURROWS (1977) nicht vermehrt unter den Patienten mit AHDS auf. Auch eine überschießende Immunantwort wird als mögliche Ursache diskutiert. So wurde durch die Injektion von Antikörpern gegen Kolonantigene eine immunmedierte Kolitis bei Hunden hervorgerufen (STROMBECK & GUIFORD, 1989). Die verabreichten Antikörper gingen Komplexe mit Antigenen von Zellen der Kolonschleimhaut ein und aktivierten damit das Komplementsystem, was zur Lyse von Zellen führte und lymphatische Zellen stimulierte, Schleimhautzellen des Kolons zu zerstören. Die dabei entstehenden Schleimhautblutungen und Nekrosen konnten bei mehreren in der Pathologie untersuchten Patienten gefunden werden. In Analogie zu diesen experimentellen Studien wird vermutet, dass bestimmte Darmbakterien, für die Stimulation der Antikörperproduktion, welche sich direkt gegen die Enterozyten richten, verantwortlich sein könnten, die dann Schleimhautläsionen hervorrufen (SPIELMAN, 1993).

Eine mögliche Beteiligung von Infektionserregern wurde ebenfalls diskutiert. LLOYD-EVANS (1978) vermutete an der Dünndarmwand fest anhaftende Bakterien, die nicht über den Kot ausgeschieden werden und somit dort nicht nachweisbar sind (LLOYD-EVANS, 1978). SLEE (1979) stellte aufgrund einer zeitgleich verlaufenden Erkrankung von Hund und Besitzer nach der Aufnahme von Schweinefleisch die Vermutung auf, dass die beim Besitzer diagnostizierte *Campylobacter*spezies auch Auslöser für den blutigen Durchfall des Hundes sein könnte (SLEE, 1979).

Da das Bild des AHDS bei Hunden den von Clostridien hervorgerufenen Durchfallerkrankungen bei Ferkeln, Lämmern und Kälbern stark ähnelt (GRINER & BRACKEN, 1953; GRINER & JOHNSON, 1954; HOGH, 1967), wurden Clostridien ebenfalls verdächtigt, für AHDS verantwortlich zu sein. Schon 1950 zeigte EGGERT, dass die orale Gabe von *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*), dem damals noch als *Bacterium enterotoxigenum* bezeichneten Erreger

des Darmbrandes beim Menschen, in magensäurefesten Gelatinekapseln verpackt, zu blutigem Durchfall und Erbrechen beim Hund führen kann (EGGERT, 1950). PRESCOTT und Mitarbeiter (1978) wiesen bei zwei Hunden *post mortem* mittels Immunfluoreszenz zahlreiche der Dünndarmoberfläche anhaftenden *C. perfringens* nach. Sie vermuteten aufgrund der mangelnden Toxizität des Erregers in Mäusen einen Typ-A-Stamm (PRESCOTT et al., 1978). SASAKI und Mitarbeiter (1999) konnten bei der Obduktion eines Patienten mittels Immunfluoreszenz *C. perfringens* auf der Jejunalschleimhaut nachweisen. Aufgrund der charakteristischen Trübung in Litmus-Milch sowie der Säureproduktion aus Glukose, Sucrose und Laktose wurden die isolierten *C. perfringens* als Typ A identifiziert (SASAKI et al., 1999). CAVE und Mitarbeiter fanden 2002 einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *C. perfringens*-Enterotoxin (CPE) mittels ELISA im Kot und dem Auftreten eines AHDS. Unter Verwendung eines Reverse-passive-latex-agglutinations-Tests konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit des Nachweises von CPE bei Hunden mit AHDS und gesunden Kontrolltieren gezeigt werden (CAVE et al., 2002).

### 1.3. **Klinische Symptome und Laborveränderungen**

Bei Patienten mit AHDS setzen Durchfall und Erbrechen häufig ganz akut ein. Meist waren diese Tiere zuvor klinisch völlig unauffällig. BURROWS (1977) beschreibt, dass das Erbrechen, welches in einem Drittel der Fälle blutig ist, meist dem hämorrhagischen Durchfall voraus geht. Allgemeinbefinden und Vitalparameter können bei mild erkrankten Hunden unverändert sein. Stark ausgetrocknete Patienten können jedoch im hypovolämischen Schock und mit hochgradig reduziertem Allgemeinbefinden vorgestellt werden (BURROWS, 1977).

### 1.4. **Histologische Veränderungen der Darmwand**

Es liegen nur wenige Obduktionsberichte von Hunden, die am AHDS verstorben waren, vor. Makroskopisch wurde bei allen eine deutliche dunkelrote Färbung in verschiedenen Bereichen des Dün- und Dickdarmes vorgefunden. Neben einer hyperämischen und teilweise ödematisierten Mukosa wurde eine große Menge an flüssigen, blutigen Ingesta festgestellt (HILL, 1972; PRESCOTT et al., 1978; SASAKI et al., 1999). HILL (1972) beschreibt zusätzlich eine blasse Leber und

blasse Nieren sowie in einigen Fällen subendokardiale Einblutungen. CAVE und Mitarbeiter untersuchten 2002 vier an blutigem Durchfall verstorbene Hunde pathologisch. Dabei wurde bei allen Tieren blutiger Dünndarminhalt bei gleichzeitig normalem oder nur leicht verändertem Dickdarminhalt gefunden. Die Dünndarmschlingen waren verdickt und zeigten Einblutungen in Mukosa oder Serosa. Die schwerwiegendsten Veränderungen wurden im Ileum beobachtet. Desweiteren waren die mesenterialen Lymphknoten vergrößert und bei einem Tier blutig imbibiert (CAVE et al., 2002).

Die Beschreibungen der histologischen Untersuchungen differieren stark. Während SASAKI und Mitarbeiter (1999) und HILL (1972) nur wenig Anzeichen für Entzündung vorfanden, stellten PRESCOTT und Mitarbeiter (1978) viele poly- und monomorphkernige Entzündungszellen in den betroffenen Bereichen der Magendarmschleimhaut fest. Desweiteren wurde eine oberflächliche Nekrose und grampositive Stäbchen, welche zwar fest der Oberfläche ansaßen, aber nicht ins Gewebe penetrierten, beobachtet (HILL, 1972; PRESCOTT et al., 1978; SASAKI et al., 1999).

## **2. Darmpathogene Clostridien**

Die Vertreter des Stammes *Clostridium* spp. sind weltweit vorkommende Verursacher von Magendarmerkrankungen bei Menschen, domestizierten Tieren und Wildtieren (SONGER, 1996). Die häufigsten Vertreter sind *C. perfringens* und *C. difficile*, welche weltweit, besonders bei Jungtieren, zu schwer verlaufenden Erkrankungen führen, aber auch als Lebensmittelverderber immer wieder Aufsehen erregen (SCALLAN et al., 2011).

### **2.1. *Clostridium perfringens***

Bei *C. perfringens* handelt es sich um ein grampositives, strikt anaerobes, Endosporen bildendes, unbegeißeltes Bakterium, welches zu den häufigsten Erregern von Magendarmerkrankungen bei Haustieren zählt. *C. perfringens* ist in der Umwelt weit verbreitet und lässt sich im Boden, in Abwässern und dem Magendarmtrakt von Mensch und Tier finden (WILLIS, 1969). Dabei ist Typ A der einzige Vertreter, der sowohl im Boden als auch im Gastrointestinaltrakt vorkommt (VINCE et al., 1972; COLLEE, 1974), während die anderen Serotypen (Typ B, C, D und E) meist auf den Magendarmtrakt von Tieren begrenzt sind (NIILO, 1980).

### 2.1.1. Toxovare von *Clostridium perfringens*

Die Einteilung in die verschiedenen Toxovare erfolgt anhand der Fähigkeit, die charakteristischen Haupttoxine alpha, beta 1, beta 2, epsilon und jota zu produzieren (Tabelle 1). Das CPE gehört zwar auch zur Gruppe der Majortoxine, wird jedoch nicht zur Differenzierung herangezogen, da es von jedem Toxovar gebildet werden kann. Am häufigsten ist es mit 3 – 4 % bei Typ A und mit 8 % in Typ D anzutreffen (SONGER, 1996).

**Tabelle 1: Serotypen von *C. perfringens*** (x = Serotyp, der in der Lage ist, ein entsprechendes Toxin zu produzieren)

Serotyp	Haupttoxine					
	alpha	beta 1	beta 2	epsilon	jota	Enterotoxin
A	x					x
B	x	x	x	x		x
C	x	x	x			x
D	x			x		x
E	x				x	x

#### 2.1.1.1. *Clostridium perfringens* Typ A

Am häufigsten verbreitet ist *C. perfringens* Typ A. Es lässt sich im Darm zahlreicher Warmblüter (TIMONEY et al., 1988) und im Boden (SMITH & WILLIAMS, 1984) finden. Dieser Serotyp gilt als Verursacher von Wundinfektionen und Gasgangrän (HATHEWAY, 1990) und spielt eine bedeutende Rolle bei Magendarmerkrankungen. Zu den wichtigsten durch Typ A hervorgerufene Erkrankungen zählen dabei die Enterotoxämie der Sauglämmer, welche sich in Ikterus und Hämoglobinurie äußert und in sechs bis zwölf Stunden zum Tode führt (MCGOWAN et al., 1958). Die Lämmer haben dabei meist eine erhöhte Anzahl von *C. perfringens* im Darminhalt. Ein ähnliches Krankheitsgeschehen kann auch bei Ziegen (RUSSELL, 1970) und Kälbern (GINTER et al., 1996) beobachtet werden. Die Tiere sind tympanisch und zeigen Ulzerationen der Labmagenmukosa. Im Labmagen wurden grampositive Bakterien auf der Mukosa und in der Submukosa nachgewiesen (DAUBE et al., 1994), die in manchen Fällen das für CPE codierende Gen trugen (cpe) (SONGER et al., 1993). Bei Hühnern äußert sich eine Infektion mit *C. perfringens* Typ A in einer nekrotisierenden Enteritis (BAINS, 1968; LONG, 1973). Dabei kann die Nekrose über die gesamte Tiefe der Mukosa des Jejunums und Ileums reichen, während im unteren Gastrointestinaltrakt vor allem eine akute Entzündung ohne Nekrose zu erkennen ist (RATZ et al., 1989). Als prädisponierende Faktoren

werden eine gleichzeitige Infektion mit Kokzidien (NAIRN & BAMFORD, 1967; HELMBOLDT & BRYANT, 1971; EL-SEEDY, 1990) und diätetische Aspekte (BRANTON et al., 1987) diskutiert. Ebenso beeinflusst die Zusammensetzung der Darmflora die Häufigkeit und die Schwere der Erkrankung (FUKATA et al., 1991). Eine milde nekrotisierende Enterokolitis mit Zottenatrophie kann bei Saugferkeln und älteren Schweinen bis zu 50 kg beobachtet werden (POPOFF & JESTIN, 1985; JOHANNSEN et al., 1986a; JOHANNSEN et al., 1986b).

In den USA gilt *C. perfringens* Typ A mit 250 000 Krankheitsfällen pro Jahr, als einer der häufigsten Verursacher von Lebensmittelvergiftungen beim Menschen (MEAD & SLUTSKER, 1999; HSIEH et al., 2009). Die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel mit mehr als  $10^5 - 10^7$  Bakterien äußert sich typischerweise nach acht bis 24 Stunden Inkubationszeit in Form von Durchfall und abdominalen Krämpfen (SHANDERA et al., 1983; BRYNESTAD & GRANUM, 2002). Ursache für diese Symptome ist die Schädigung des Schleimhautepithels durch CPE. Dies führt zu Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten (MCDONEL & DUNCAN, 1975). Meist verschwinden die Symptome wieder selbstständig nach 24 bis 48 Stunden, so dass es selbst bei chronisch kranken, geschwächten oder sehr jungen und alten Menschen nur selten zu Todesfällen kommt (SHANDERA et al., 1983; BRYNESTAD & GRANUM, 2002). Es liegen jedoch Fallberichte von tödlich verlaufenden Lebensmittelvergiftungen bei gesunden mittelalten Personen vor, die in psychiatrischen Einrichtungen untergebracht waren (BOS et al., 2005). Es wird vermutet, dass Psychopharmaka Konstitutionen verursachten und somit die Mukosa dieser Patienten längere Zeit unter Toxineinwirkung stand.

#### **2.1.1.2. *Clostridium perfringens* Typ B**

*C. perfringens* Typ B ist der Erreger der Lämmerdysenterie. Wenige Tage alte Lämmer zeigen eine massive Enteritis, verbunden mit gravierenden Ulzerationen des Dünndarmes (FRANK, 1956; ROBERTS, 1958). Meist verläuft die Erkrankung perakut mit plötzlichen Todesfällen. Auch akute Verläufe, verbunden mit schweren Abdominalschmerzen und blutigem Durchfall, enden häufig mit dem Tode. Typ B kann ebenfalls zu hämorrhagischer Diarrhoe bei Ziegen, Kälbern und Fohlen führen (FRANK, 1956; ROBERTS, 1958; STUBBINGS, 1990).



### 2.1.1.3. *Clostridium perfringens* Typ C

Infektionen mit *C. perfringens* Typ C verursachen Enteritiden und Enterotoxämien bei zahlreichen Haustieren und dem Menschen. Dabei sind sowohl die klinischen Anzeichen, als auch die makroskopischen und histopathologischen Veränderungen bei allen Spezies ähnlich. Der Verlauf reicht von perakut bis chronisch und geht meist mit abdominalen Schmerzen, reduziertem Allgemeinbefinden und blutigem Durchfall einher. Eine Infektion kann sich in chronischen Fällen auch durch persistierenden, nicht blutigen Durchfall äußern.

Besonders neugeborene Tiere, die noch keine etablierte Darmflora besitzen, sind für die Überwucherung von *Clostridium* spp. sehr empfänglich. Es wird vermutet, dass eine Veränderung der Darmflora durch plötzlichen Diätwechsel die Vermehrung von *C. perfringens* Typ C begünstigt (TIMONEY et al., 1988).

An einer Infektion mit *C. perfringens* Typ C erkranken vor allem ein bis zwei Tage alte Ferkel. Ist die Erkrankung einmal in einer Herde etabliert, verläuft sie häufig endemisch, mit einer Morbidität zwischen 30 – 50 % und einer Mortalität von 50 – 100 % (NIILO, 1988; OHNUNA et al., 1992). Die Tiere versterben meist nach einer Episode mit blutigem Durchfall innerhalb von 24 Stunden. Ähnliche Krankheitsbilder konnten auch bei Lämmern (Struck), Ziegen, Rindern, Pferden, Hühnern, Hunden und auch Menschen in den USA, Großbritannien und Japan nachgewiesen werden (MOON & BERGELAND, 1965; NIILO et al., 1974; DICKIE et al., 1978; HOWARD-MARTIN et al., 1986; NIILO, 1987; MACKINNON, 1989). Bei diesen Säugetierspezies sind die pathologischen Veränderungen besonders im Dünndarm zu sehen, wobei Zäkum und Kolon vereinzelt involviert sein können. In perakuten Fällen ist vor allem eine hochgradig nekrotisierende und hämorrhagische Enteritis mit Emphysemen und blutigen Ingesta zu beobachten (SONGER, 1998; SONGER & UZAL, 2005). Histologisch ist eine hämorrhagische Nekrose zu erkennen, welche von der Mukosa ausgehend fortschreitet, bis alle Wandschichten betroffen sind. Als Charakteristikum gelten Fibrinthromben, welche die oberflächlichen Arteriolen und Venen verschließen (SONGER & UZAL, 2005). Beim Menschen verursacht *C. perfringens* Typ C eine *Enteritis necroticans*, auch bekannt als Darmbrand. Es handelt sich um eine Erkrankung, die ursprünglich in Papuaneuguinea (JOHNSON & GERDING, 1997) endemisch war und die auch heute noch

sporadisch in Südostasien beobachtet wird. Ebenso tritt diese Erkrankung bei Diabetikern aufgrund der reduzierten Darmmotilität häufiger auf (PETRILLO et al., 2000; MATSUDA et al., 2007).

#### **2.1.1.4. *Clostridium perfringens* Typ D**

Eine Enterotoxämie, hervorgerufen durch *C. perfringens* Typ D, wird vor allem bei Schafen jeden Alters, mit Ausnahme von Neugeborenen, beobachtet (TIMONEY et al., 1988). Es wird ein Zusammenhang zwischen der Erkrankung und zu energiereicher Fütterung, in Form von Milch oder Kraftfutter, nach dem Absetzen vermutet (POPOFF, 1984). Im Vordergrund der Erkrankung steht weniger eine Enteritis, sondern vermehrt zentralnervöse Symptome, wie Mattheit, Opisthotonus und Krämpfe (POPOFF, 1984; NILO, 1993). Ein weiteres Kennzeichen dieser Erkrankung, welches auch namensgebend ist, sind die in der Sektion zu findenden breiigen Nieren (Breinierenkrankheit). Diese Veränderung tritt jedoch erst *post mortem*, aufgrund der beschleunigten Autolyse des hyperämischen und durch Toxine geschädigten Gewebes ein (SONGER, 1996). Eine Enterotoxämie mit *C. perfringens* Typ D kann ebenso bei Kälbern (AICHELMAN et al., 1956), seltener adulten Rindern (MUMFORD, 1961), Ziegen (OXER, 1956), Kamelen und Pferden (CARROLL et al., 1987; STUBBINGS, 1990) auftreten.

#### **2.1.1.5. *Clostridium perfringens* Typ E**

Die Pathogenität von *C. perfringens* Typ E ist bisher nicht geklärt. Es gibt lediglich einzelne Fallberichte aus Großbritannien von 1963 und eine Beschreibung aus dem Jahr 1967 aus Australien (HART & HOOPER, 1967), bei denen Enterotoxämien mit *C. perfringens* Typ E in Zusammenhang gebracht werden. Eine Veröffentlichung beschreibt den Nachweis von *C. perfringens* Typ E und Jota-Toxin *post mortem* im Darm von Rindern und Schafen. Diese Tiere hatten vor dem Verenden keinerlei Symptome gezeigt (STERNE & THOMSON, 1963).

#### **2.1.2. Toxine**

*C. perfringens* ist in der Lage 17 Toxine zu produzieren (MCDONEL, 1980b), wovon jedoch nur wenige nachgewiesenermaßen pathogene Eigenschaften besitzen. Unterschieden werden die fünf Serotypen, auch Toxovare genannt, von *C. perfringens* anhand der von ihnen produzierten Haupttoxine alpha, beta 1 und

2, epsilon und jota (MCDONEL, 1980b), die aufgrund ihrer Neutralisation durch Antikörper bei der intradermalen Injektion bei Meerschweinchen (Dermonekrose) und der intravenösen Verabreichung bei Mäusen (Letalität) definiert werden (SMITH, 1979).

#### **2.1.2.1. Alpha-Toxin**

Das Alpha-Toxin, eine multifunktionelle Phospholipase, bewirkt eine Hydrolyse von Phospholipiden in den Membranen von Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten sowie Endothel- und Muskelzellen. Dadurch kommt es zu einer Lyse der Zellen (MOLLBY et al., 1974; SMITH, 1979). Desweiteren werden Thrombozytenaggregation (OHSAKA et al., 1978) und Histaminfreisetzung aus Zellen (HABERMANN, 1960) beobachtet. Das Alpha-Toxin wird von allen *C. perfringens*-Typen produziert (SONGER, 1996).

#### **2.1.2.2. Beta-Toxine**

Das Beta-1-Toxin ist ein ca. 38 kDa schweres Protein (SAKURAI & FUJII, 1987), welches große Ähnlichkeit mit dem Alpha-Toxin, Gamma-Toxin und Leucocidin von *Staphylococcus aureus* aufweist (HUNTER et al., 1993). Es verursacht Poren in den Membranen empfindlicher Zellen und bewirkt somit deren Schwellung und Lyse (SAKURAI & DUNCAN, 1978; STEINTHORSDOTTIR et al., 2000; NAGAHAMA et al., 2003). Gereinigtes Beta-1-Toxin führt, unter die Haut von Meerschweinchen und Mäusen appliziert, zu Austritt von Plasma aus Gefäßen, Ödemen und Hautnekrosen (SAKURAI & DUNCAN, 1977). Das Toxin heftet sich an Endothelzellen intestinaler Gefäße, was vermutlich zur Endotheldegeneration mit anschließender Thrombose führt. Dies könnte die charakteristischen intestinalen Nekrosen erklären (MICLARD et al., 2009).

Vor wenigen Jahren konnte aus *C. perfringens* Typ C ein weiteres Toxin isoliert werden, welches man als Beta-2-Toxin bezeichnete. Dieses ca. 28 kDa schwere Molekül hat nur wenig Ähnlichkeit mit dem Beta-1-Toxin (zu 15 % identisch) (GIBERT et al., 1997), so dass Antikörper gegen Beta-2-Toxin nur schwach mit dem Beta-1-Toxin reagieren (GIBERT et al., 1997). Es ist ab einer Dosis von 3 µg tödlich für Mäuse, hat einen zytotoxischen Effekt auf Chinese-Hamster-Ovary-Zellen und induziert eine hämorrhagische Nekrose der Darmmukosa beim Meerschweinchen (JOLIVET-REYNAUD et al., 1986).

### 2.1.2.3. Epsilon-Toxin

Das Epsilon-Toxin wird als Protoxin produziert, welches seine Potenz um ein tausendfaches steigert, wenn die terminale Aminosäure im Darm durch Trypsin abgespalten wird (BHOWN & HABEERB, 1977). So verändert, bewirkt das Epsilon-Toxin vor allem eine erhöhte Permeabilität des Darmes. Dies ermöglicht einen Übertritt des Toxins in die Blutbahn (JANSEN, 1967). Die meisten Schäden verursacht das Epsilon-Toxin im Gehirn. Dort führt es zu Kolliquationsnekrosen, perivaskulären Ödemen und Blutungen in den Meningen (BUXTON et al., 1978). Zusätzlich wird eine erhöhte Permeabilität der Kapillaren beobachtet. Dies hat Ödembildung (FINNIE, 1984b) und einen erhöhten intrakraniellen Druck zur Folge (BUXTON & MORGAN, 1976). Hierdurch können Nekrosen (BUXTON et al., 1978) und eine bilaterale Enzephalomalazie entstehen (HARTLEY, 1956; FINNIE, 1984b, 1984a). Als pathognomonisch gilt desweiteren die beschleunigte *post mortem* einsetzende Autolyse der Nieren. Eine Hyperglykämie und Glukosurie wird aufgrund der durch Epsilon-Toxin ausgelösten schnellen Mobilisation von Glykogen häufig beobachtet (GARDNER, 1973; NILO, 1993). Sowohl *C. perfringens* Typ B als auch *C. perfringens* Typ D produzieren parallel zum Epsilon-Toxin eine Hyaluronidase, welche die Verteilung des Toxins im Gewebe erleichtert.

### 2.1.2.4. Jota-Toxin

Das Jota-Toxin, welches vom *C. perfringens* Typ E produziert wird, ist Verursacher der Antibiotika-assoziierten Enterotoxämie bei Kälbern und Lämmern (SONGER, 1996). Das Jota-Toxin besteht aus zwei Teilen. Ein Bereich ist für die Anbindung und für die Einschleusung in die Zelle verantwortlich (BLOCKER et al., 2001; NAGAHAMA et al., 2002), während der zweite, enzymatische Teil die zelleigenen Stoffwechselvorgänge behindert (BLOCKER et al., 2001; BARTH et al., 2004; SAKURAI et al., 2009). Nach intradermaler Verabreichung des Toxins bei Meerschweinchen kommt es zu einer erhöhten kapillaren Permeabilität. Intravenös verabreicht, wirkt es letal (CRAIG & MILES, 1961).

### 2.1.2.5. Enterotoxin

Das CPE, ein ca. 35 kDa schweres Polypeptid, bestehend aus 319 Aminosäuren (CZECZULIN et al., 1993), wird von ca. 2 – 5 % der *C. perfringens*-Isolaten

produziert (MCCLANE, 2007). Meist gehören diese das CPE-Gen tragende Vertreter zur *C. perfringens* Typ A Gruppe, vereinzelt wird das Toxin jedoch auch von Angehörigen von Typ C und Typ D produziert. Klinische Relevanz hat es hauptsächlich bei Lebensmittelintoxikationen beim Menschen durch den Verzehr von kontaminierten Fleisch- und Geflügelprodukten (MCCLANE, 2001b). Nach Aufnahme überlebt meist nur ein kleiner Teil der Clostridien die Magensäure. Die Clostridien jedoch, die den Darm erreichen, beginnen dort mit der Sporulation und setzen das CPE frei. Das Toxin führt nach kurzer Inkubationszeit von sechs bis zwölf Stunden zu Diarrhoe und Magenkrämpfen. Meist klingt diese Durchfallepisode nach 24 Stunden jedoch wieder ab. CPE-bedingte Durchfälle können ausschließlich bei alten und immunsupprimierten Personen zu schwerwiegenden Problemen führen.

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass CPE-produzierende Clostridien auch für 5 – 20 % der Antibiotika assoziierten und der sporadischen Diarrhoe beim Menschen verantwortlich sind (MCCLANE, 2000; SPARKS et al., 2001). Auffällig dabei ist, dass zwischen den für Lebensmittelintoxikationen und den für Antibiotika assoziierter Diarrhoe verursachenden Stämmen genotypische Unterschiede bestehen (COLLIE & MCCLANE, 1998). Das CPE-codierende Gen (*cpe*) befindet sich bei Lebensmittelintoxikationen verursachenden Stämmen auf dem Chromosom, während es bei allen anderen auf einem Plasmid liegt (COLLIE & MCCLANE, 1998; SPARKS et al., 2001).

Die Effekte des CPE auf den Dünndarm wurden bereits in zahlreichen Studien untersucht (DUNCAN & STRONG, 1969; MCDONEL, 1980a; SHERMAN et al., 1994; MCCLANE & CHAKRABARTI, 2004). Am häufigsten wurde hierfür der Kaninchendarm als Modell verwendet, wobei das Ileum am sensitivsten erschien. Hier verursachte das CPE nach weniger als 30 Minuten histologische Schäden, wie eine starke Verkürzung der Villi und eine Desquamation des Epithels (MCDONEL & DUNCAN, 1977; MCDONEL et al., 1978; SHERMAN et al., 1994; MCCLANE, 2001a). Erklären lassen sich diese Effekte auf zellulärer Ebene: CPE bindet vermutlich mittels bestimmter Claudine und/oder 45 – 50 kDa großen Protein-Rezeptoren an die Enterozyten. Dort anhaftend verbindet es sich mit weiteren Molekülen zu einem 450 kDa schweren Hexamer (CH-1), bestehend aus sechs CPE-Molekülen und mehreren Claudinen (ROBERTSON et al., 2007). Diese Komplexe verändern durch Formung einer funktionellen Pore die

Permeabilität der Zelle für Kalzium-Ionen (MCCLANE & WNEK, 1990). Dies führt zu morphologischen Schäden und Zelltod: in geringen Mengen (1 µg/ml) in Form von Apoptose und in größeren Mengen (10 µg/ml) in Form von Onkose (CHAKRABARTI et al., 2003). Ein zweites, ca. 600 kDa schweres Hexamer, bestehend aus CPE-Molekülen, Claudinen und Occludin konnte zwar *in vitro* gefunden werden (SONODA et al., 1999), war allerdings bei Versuchen an Mäusen *in vivo* nicht nachzuweisen. Es entsteht durch eine Komplexbildung von CPE mit Claudin an der basolateralen Membranseite. Dieser Komplex führt zu einer strukturellen Zerstörung der Tight Junctions. Somit kommt es zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität. Dies ist jedoch eher als ein *in-vitro*-Effekt zu sehen, da das CPE nicht in die Zelle penetriert (MCCLANE, 1994), sondern seinen Wirkungsort vornehmlich an der apikalen Seite der Enterozyten hat und folglich *in vivo* kein Kontakt zur basolateralen Seite der Zelle besteht.

Im Kolon konnte zwar die Anbindung großer Mengen von CPE an die Darmwand beobachtet werden, jedoch zeigte das Toxin im Kaninchenmodell keinerlei Wirkung im Kolon (DUFFY et al., 1982). Als mögliche Erklärung dafür wurde ein Fehlen von Rezeptoren angenommen. Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass CPE-Rezeptoren tatsächlich nur in den Krypten des Dünndarmes zu finden sind (KATAHIRA et al., 1997).

Auch der Hund wurde als Modell für die Wirkung des CPE herangezogen. Hierfür wurde das Toxin in Form von magensaftresistenten Kapseln verabreicht oder mittels Duodenalfistel direkt im Dünndarm platziert. Damit konnte bei 8/9 Tieren Durchfall ausgelöst werden (BARTLETT & WALKER, 1972).

### 2.1.3. Vorkommen bei Hunden

Bei Hunden werden Clostridien in 28 – 34 % aller Fälle für die Entstehung von Durchfallerkrankungen verantwortlich gemacht. Die Symptome sind dabei sehr variabel (CAVE et al., 2002).

#### 2.1.3.1. Nachweismethoden

Die Symptome einer *C.-perfringens*-assoziierten Diarrhoe bei Hunden reichen von mildem, selbstlimitierendem bis hin zu hochgradig blutigem Durchfall, der selektiv Dün- oder Dickdarm, aber auch beide Darmabschnitte betreffen kann. Ein Nachweis von Bakterien und Toxin kann auf eine Infektion hinweisen (SASAKI et al., 1999; WEESE et al., 2001).

#### **2.1.3.1.1. Bakteriennachweis**

Aufgrund des häufigen Vorkommens von *C. perfringens* (bei mehr als 80 % der Hunde) als Teil der physiologischen Dickdarmflora ist der Nachweis von *C. perfringens* im Kot nicht zur Diagnose einer *C.-perfringens*-assoziierten Diarrhoe beim Hund geeignet (MARKS et al., 1999; WEESE et al., 2001).

#### **2.1.3.1.2. Quantifizierung der Endosporen**

Da die Enterotoxinfreisetzung an die Sporulation gekoppelt ist, wurde ein Zusammenhang zwischen der Menge der produzierten Sporen und der Schwere der Erkrankung vermutet. Mehrere Studien jedoch belegen, dass dies nicht der Fall ist. Somit eignet sich der mikroskopische Nachweis von Clostridiensporen im Kot nicht als diagnostisches Mittel zur Diagnose einer Clostridienerkrankung (WEESE et al., 2001; MARKS et al., 2002).

#### **2.1.3.1.3. Toxinnachweis**

Zwei Immunoassays, zum einen ein Reverse Passive Latex Agglutination Assay (RPLA), zum anderen ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), werden derzeit in Veterinärlaboren verwendet. Beide Tests wurden jedoch für die Humanmedizin etabliert und bisher noch nicht auf ihre Spezifität und Sensitivität zum Nachweis von CPE im Kot von Hunden überprüft. Bei der Benutzung des RPLA scheint es, verglichen mit verschiedenen ELISA, häufiger zu falsch positiven Resultaten zu kommen (BERRY et al., 1988; MARKS et al., 1999). Die Tatsache, dass bei 14 % der gesunden Hunde ebenfalls CPE mittels ELISA nachgewiesen werden konnte, legt die Vermutung nahe, dass die Anwesenheit des Toxins alleine nicht verantwortlich für die Symptome ist, sondern dass dabei die CPE-Konzentration im Darm eine entscheidende Rolle spielt (MARKS et al., 2002).

#### **2.1.3.1.4. Nachweis des Toxingens**

Aufgrund der hohen Prävalenz von *C. perfringens* im Darm gesunder Tiere ist der Nachweis des Erregers mittels PCR aus Kot von begrenzter Aussagekraft. Auch die Relevanz des Nachweises von für Alpha-Toxin codierendes Gen (*cpa*) ist fraglich, da dieses Toxin als wenig pathogen gilt. Als sinnvoller wird die Suche nach Genomen, welche Toxine mit einer vermutlich höheren Virulenz (*cpe*, *cpb2*) codieren, erachtet (MARKS et al., 2011). Jedoch wird der Genomnachweis als alleiniger Test, aufgrund der noch unklaren Aussagekraft, derzeit nicht empfohlen

(MARKS et al., 2011). Als verlässlichstes diagnostisches Mittel zur Diagnose einer CPE-assoziierten Durchfallerkrankung gilt derzeit die Kombination von PCR für *cpe* und ELISA für CPE. In einer Studie von MARKS und Mitarbeiter (2002) mit 32 an Durchfall erkrankten und 100 gesunden Hunden wurde mittels ELISA bei 34 % der erkrankten und 14 % der gesunden Tiere CPE im Kot nachgewiesen. Trotz eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Gruppen, war der Anteil der CPE-positiven Kotuntersuchungen bei den asymptomatischen Hunden relativ hoch. Wurde der ELISA mit dem PCR-Nachweis kombiniert, so waren bei 28 % der erkrankten, jedoch nur noch bei 4 % der gesunden Tiere beide Tests positiv. Dieses Resultat spricht dafür, dass der CPE-ELISA in einigen Fällen falsch positiv sein kann, die Spezifität jedoch steigt, wenn der CPE-Nachweis zusammen mit dem *cpe*-Nachweis beurteilt wird (MARKS et al., 2002).

#### 2.1.3.2. Therapieoptionen

Derzeit gibt es keinen Beweis dafür, dass der Einsatz von Antibiotika bei einer unkomplizierten, von *C. perfringens* hervorgerufenen Diarrhoe, irgendwelche Vorteile erbringt. Zudem verlangt die zunehmende Anzahl an Berichten über Antibiotikaresistenzen einen gewissenhaften Antibiotikaeinsatz (GUARDABASSI et al., 2004; WEESE, 2011). Erst wenn ein Patient infolge einer *C.-perfringens*-Infektion Anzeichen einer systemischen Erkrankung, wie z. B. Fieber oder Sepsis entwickelt, sollten Antibiotika verabreicht werden (MARKS et al., 2011). Zu den empfohlenen Medikamenten zählen derzeit Ampicillin, Erythromycin, Metronidazol und Tylosin (MARKS & KATHER, 2003). Die meisten Isolate waren für diese Antibiotika sensibel, während bei Tetracyklinen *in vitro* bei 21 % der Isolate Resistenzen festgestellt werden konnten (KATHER et al., 2006).

#### 2.2. *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* (*C. difficile*), ein stäbchenförmiges, grampositives, anaerobes, Endosporen bildendes Bakterium, gilt als ein wichtiger Durchfallerreger bei zahlreichen Spezies. Es erlangt zunehmende Beachtung als Verursacher nosokomialer Erkrankungen, insbesondere im Rahmen des Antibiotika assoziierten Durchfalles beim Menschen (WILCOX, 1996; HOGENAUER et al., 1998; LYERLY et al., 1998). Ebenso wie bei *C. perfringens* ist die vegetative Form von *C. difficile* nur in geringem Maße für Sauerstoff



tolerant. Die Sporen jedoch, welche sich sofort außerhalb des Körpers bilden, sind sehr resistent und können jahrelang in der Umwelt überleben.

Ursprünglich wurde *C. difficile* für ein apathogenes Bakterium gehalten, da es im Darm von gesunden Neugeborenen gefunden wurde (HALL & O'TOOLE, 1935). Warum es bei Kindern keine Symptome auslöst, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass sie eine ungenügende Anzahl an Toxin-spezifischen Oberflächenrezeptoren besitzen (LYERLY et al., 1988; KNOOP et al., 1993). Seinen Namen erhielt *C. difficile* (lat. difficilis: schwierig, schwer) aufgrund seines langsamen Wachstums und der Schwierigkeit, den Erreger zu isolieren (KELLY & LAMONT, 1998). In den 70-iger Jahren erkannte man einen Zusammenhang zwischen dem Erreger und der Antibiotika-assoziierten, pseudomembranösen Kolitis. *C. difficile* gilt heute als eine der häufigsten Ursachen von nosokomialen Infektionen beim Menschen. Auch bei Pferden ist *C. difficile* als Verursacher der nekrotisierenden, hämorrhagischen Kolitis beim Fohlen und der akuten Kolitis bei adulten Tieren bekannt (BAVERUD et al., 1997; DONALDSON & PALMER, 1999).

### 2.2.1. Toxine

*C. difficile* besitzt mehrere Toxine. Die beiden wichtigsten sind die potenten Exotoxine A und B, welche zu Entzündungsreaktionen in der Darmmukosa und zu Diarrhoe führen (BORRIELLO, 1998; KELLY & LAMONT, 1998; VOTH & BALLARD, 2005). Zusätzlich produzieren manche Stämme eine Adenosin-Diphosphat-Ribosyltransferase (ADT). Die Bedeutung dieses Toxins in der Pathogenese von Durchfallerkrankungen ist jedoch nach wie vor ungeklärt (POPOFF et al., 1988; PERELLE et al., 1997).

Toxin A und B gehören aufgrund ihres großen Molekulargewichtes von 308 kDa bzw. 269,6 kDa zur Gruppe der Large Clostridial Toxins (JANK & AKTORIES, 2008). Beide besitzen ein ähnlich aufgebautes Grundgerüst, welches als ABCD-Model bezeichnet wird (JANK & AKTORIES, 2008). Es besteht aus einem biologisch aktiven N-terminalen Bereich (A), einer C-terminalen Anbindungsregion (B), einer Cysteinprotease (C) und einem hydrophoben Anteil (D). Der genaue Ablauf der Toxinaufnahme in die Zelle ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass dabei vier Schritte ablaufen: Die B-Region bindet hoch spezifisch an die Rezeptoren der Zelloberfläche und wird in das

endosomale Kompartiment endozytiert. Der dort herrschende niedrigere pH-Wert bewirkt eine Konformationsänderung im Molekül. Dies ermöglicht die Translokation ins Zytosol (BARTH et al., 2001). Es wird vermutet, dass die große D-Region an der für die Translokation nötigen Bildung einer Pore mit beteiligt ist. Durch Autoproteolyse spaltet sich die A-Region ab und gelangt als einzige ins Zytosol. Vermutlich ist die Cysteinprotease bei dieser Abspaltung mit involviert (BARTH et al., 2001). Im Zytosol angekommen, katalysiert das Enzym die Entstehung von Rho-GTPase. Diese führt zur Depolymerisation der Aktinfilamente, Zerreißung des Zytoskelettes und letztendlich zum Zelltod (JUST et al., 1995b; JUST et al., 1995a; JANK et al., 2007).

Toxin A und Toxin B sind zusammen mit gemeinsamen Regulatoren an einem bestimmten Ort im Genom codiert (Pathogenicity Locus) (RUPNIK et al., 2005). Häufig werden beide gleichzeitig exprimiert. Es gibt jedoch auch Erkrankungsfälle, bei denen die virulenten Stämme lediglich für Toxin B codierten. Dies beweist die Pathogenität für Toxin B und stellt somit gleichzeitig die Beteiligung von Toxin A am Krankheitsgeschehen in Frage. Auch die Verwendung von Gen-Knock-out-Systemen für Clostridien (HEAP et al., 2007) konnte zeigen, dass Toxin A für die Virulenz des Erregers nicht essentiell ist (LYERLY et al., 1985; LYRAS et al., 2009). Es gibt jedoch einen Fallbericht, in dem Toxin A für die Entstehung des Durchfallgeschehens verantwortlich gemacht wurde (KUEHNE et al., 2010).

### 2.2.2. Vorkommen bei Hunden

Während *C. difficile* in der Humanmedizin als Verursacher nosokomialer Infektionen zunehmend an Wichtigkeit erlangt (JHUNG et al., 2008), ist die Rolle des Bakteriums in Hinsicht auf Durchfallerkrankungen bei Hund und Katze nach wie vor ungeklärt. Ein Zusammenhang zwischen *C.-difficile*-Toxinen im Kot und Darmerkrankungen beim Hund wurde in mehreren Studien nachgewiesen (WEESE et al., 2001; CAVE et al., 2002; MARKS et al., 2002). Ebenso besteht der Verdacht, dass *C. difficile* an der Entstehung von akutem blutigen Durchfall beteiligt sein könnte (CAVE et al., 2002). Ein Versuch, die Symptomatik bei gesunden Hunden durch Applikation von *C. difficile* hervorzurufen, scheiterte jedoch (CLOOTEN et al., 2003). *C. difficile* ist zudem im Kot von bis zu 58 % gesunder Hunde zu finden (WEESE et al., 2001; CAVE et al., 2002). Dabei ist die Inzidenz bei jungen Hunden und Hunden, die Kontakt zu hospitalisierten

Patienten hatten, höher (WEBER et al., 1989; CAVE et al., 2002; LEFEBVRE et al., 2006).

#### **2.2.2.1. Nachweismethoden**

Da *C.-difficile*-Infektionen völlig asymptomatisch verlaufen können, aber auch hochgradigen akuten blutigen Durchfall auslösen können, gibt die Klinik keinen Hinweis auf die mögliche Ursache. Für die Diagnose ist deshalb ein Bakterien- oder Toxinnachweis unerlässlich (CAVE et al., 2002).

##### **2.2.2.1.1. Bakteriennachweis**

Der Nachweis des Bakteriums kann mittels Kot-PCR, Antigen-ELISA oder Anzucht auf einem Selektivmedium geführt werden. In der Humanmedizin kommt zunehmend eine Real-Time PCR zum Einsatz, welche mit ihrer hohen Sensitivität schon geringe Mengen des Keims zuverlässig identifiziert (SHAKIR et al., 2012). Da jedoch beim Hund geringe Mengen an *C. difficile* vermutlich zur physiologischen Darmflora gehören, ist die Interpretation einer positiven PCR schwierig. Zum Ausschluss einer Infektion mit *C. difficile* ist sie jedoch durchaus wertvoll. Eine Kultur benötigt unter anaeroben Kautelen mehrere Tage und lässt keine Unterscheidung zwischen Toxin produzierenden und apathogenen Stämmen zu. Der Antigen-ELISA hat den Vorteil einer hohen Sensitivität und ist leicht und schnell durchzuführen. Da er jedoch die Glutamatdehydrogenase nachweist, welche sich sowohl in Toxin produzierenden, als auch in nicht Toxin produzierenden Clostridien befindet, kann lediglich ein negatives Ergebnis eine Infektion ausschließen. Aufgrund der Schwachstellen beider Methoden wird derzeit eine Kombination aus Toxin-ELISA und Bakteriennachweis angeraten (MARKS et al., 2011).

##### **2.2.2.1.2. Toxinnachweis**

Der culture cytotoxicity assay (CTA) stellt derzeit den Goldstandard zum Nachweis von *C.-difficile*-Toxinen im Kot dar. Aufgrund des zeitlichen Aufwandes und der hohen Kosten werden allerdings meist kommerzielle ELISA diesem Nachweisverfahren vorgezogen. Während jedoch diese ELISA in der Humanmedizin sehr zuverlässige Resultate erbringen, wurde bei Hunden nur eine schlechte Sensitivität und Spezifität nachgewiesen (CHOUICHA & MARKS, 2006).

### **2.2.2.1.3. Nachweis des Toxingens**

Die sensitivste Methode des Erregernachweises stellt die Kotuntersuchung mittels PCR dar. Ein zusätzlicher Vorteil dieser PCR-Untersuchung ist die Möglichkeit Toxin A und B codierende Stämme direkt nachzuweisen. Für die Diagnosestellung einer *C.-difficile*-Infektion wird derzeit eine Kombination aus Toxinnachweis mittels ELISA und Toxingennachweis mittels PCR empfohlen (MARKS et al., 2011).

### **2.2.2.2. Therapieoptionen**

Da angenommen wird, dass eine Infektion mit *C. difficile* in der Regel Antibiotika-assoziiert ist, wird von einer Antibiotikatherapie, ausgenommen bei Verdacht auf eine Translokation mit Sepsis, abgeraten. In Fällen von Sepsis wird häufig Metronidazol oral oder intravenös eingesetzt. In der Humanmedizin kommt vorwiegend Vancomycin zum Einsatz. Aufgrund der Gefahr einer Resistenzbildung und des fraglichen Erfolges, sollte der Einsatz von Antibiotika sehr restriktiv gehandhabt werden. Eine Substitution von löslichen Ballaststoffen wird häufig empfohlen, da diese das Darmmilieu zugunsten apathogener Bakterien verändern soll. Deren Wirksamkeit wurde jedoch in prospektiven Therapiestudien bisher noch nicht belegt. Auch eine Therapie mit Probiotika wird in der Humanmedizin kontrovers diskutiert (PILLAI & NELSON, 2008; MCFARLAND, 2009). Erste Studien mit Di-Trioctahedral als Absorbens (WEESE et al., 2003) und Kottransplantationen (YOON & BRANDT, 2010) zeigten sich erfolgsversprechend.

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Endoskopiестudie**

Die Endoskopiестudie bestand aus zwei Gruppen von Hunden: einer Gruppe am AHDS erkrankter Tiere und einer Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten mit chronischen gastrointestinalen Problemen oder Verdacht auf intestinale Fremdkörper.

##### **1.1. Tiere**

Neben der Patientengruppe, welche aus Hunden mit AHDS bestand, wurde zum Vergleich hinsichtlich des Nachweises von *Clostridium* spp. in Dünn- und Dickdarm, eine Gruppe von Hunden mit unterschiedlichen chronischen gastrointestinalen Problemen oder Verdacht auf Fremdkörper herangezogen. Alle Tiere wurden in der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) endoskopiert.

##### **1.1.1. Patienten**

Bei den Patienten in dieser Studie handelte es sich um zehn Hunde, die im Zeitraum von August 2010 bis Dezember 2011 in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München mit AHDS vorgestellt wurden. Es wurden Untersuchungen zum Ausschluss bekannter Ursachen von hämorrhagischer Diarrhoe durchgeführt.

##### **1.1.1.1. Einschlusskriterien**

In die Studie aufgenommen wurden Hunde mit blutigem Durchfall, der seit weniger als drei Tagen bestand. Die Einwilligung der Patientenbesitzer zur Durchführung einer Endoskopie musste vorliegen.

##### **1.1.1.2. Ausschlusskriterien**

Ausgeschlossen aus der Studie wurden Tiere mit Erkrankungen, die potentiell zu hämorrhagischem Durchfall führen können. Dazu zählten bestimmte Infektionen (Parvovirose, Parasiten), Organversagen (Leber, Niere), Hypoadrenokortizismus, Pankreatitis, Koagulopathien, fokale Darmveränderungen (Neoplasie, Invagination) und die Aufnahme von potentiell die Magendarmschleimhautschädigenden Medikamenten.

Es wurde dafür eine genaue Anamnese erhoben und erfragt, ob die Tiere in den letzten zwei Wochen potentiell die Magendarmschleimhaut-schädigende Medikamente wie z. B. nichtsteroidale Antiphlogistika oder Glukokortikoide, erhalten hatten. Tiere, bei denen aufgrund von verlängerten Gerinnungszeiten (Prothrombinzeit  $> 64,4$  s, aktivierte partielle Thrombinzeit  $> 26,2$  s) oder erniedrigter Thrombozytenzahl ( $< 100 \times 10^3/l$ ) eine Hämostasestörung vermutet wurde, wurden nicht als Studienpatienten zugelassen. Die Prothrombinzeit (PT) und aktivierte partielle Thrombinzeit (apTT) wurden mit Hilfe des Coagulometers CL<sup>®</sup> (Firma BE Behnk Elektronik, Norderstedt, Deutschland) ermittelt.

Ein Nierenversagen wurde bei Tieren mit mehr als dreifach erhöhten Nierenwerten (Harnstoff  $> 24,9$  mmol/l, Kreatinin  $> 351,0$   $\mu\text{mol/l}$ ), bei gleichzeitigem Vorliegen eines inadäquat konzentrierten Urins (spezifisches Gewicht  $< 1,030$ ) vermutet. Als verdächtig für ein Leberversagen wurde die Veränderung von mindestens drei Leberfunktionsparametern angesehen (Serumgallensäuren  $> 20,0$   $\mu\text{mol/l}$ , Albumin  $< 24,6$  g/l, Bilirubin  $> 4,8$   $\mu\text{mol/l}$ , Glukose  $< 5,4$  mmol/l). Hierfür wurde ein Serumprofil mittels Hitachi 912 Automatic Analyzer<sup>®</sup> (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Ebenfalls ausgeschlossen von der Studie wurden Hunde, welche im Ultraschall Hinweise auf eine gastrointestinale Neoplasie (z. B. fokal verdickte Darmwand, aufgehobene Darmwandschichtung, vergrößerte abdominale Lymphknoten) hatten. Eine Pankreatitis wurde anhand einer unauffälligen Pankreasgegend bei der Ultraschalluntersuchung ausgeschlossen. Waren im Ultraschall oder Röntgen Hinweise auf eine fokale Darmveränderung, eine Invagination oder einen intestinalen Fremdkörper zu sehen, so war dies ebenfalls ein Ausschlusskriterium. Ein vollständiger Abdomenultraschall wurde von einem erfahrenen Internisten (Diplomate Internal Medicine des European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals) mit dem LOGIQ P6 (Firma GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA) durchgeführt.

Ein Hypoadrenokortizismus wurde bei normalen Elektrolytwerten und Vorliegen eines Stressleukogramms ausgeschlossen. Eine Infektion mit Viren oder Parasiten, die zu blutigem Durchfall führen können, machte eine Studienteilnahme ebenfalls unmöglich. Zum Ausschluss hierfür wurde eine Flotation nach Standardverfahren mittels einer 29,5%-igen Natriumnitratlösung (Firma Janssen-Cilag, Neuss,

Deutschland) zum Nachweis von Haken-, Spul- und Peitschenwürmern durchgeführt. Auf Giardien wurde mit Hilfe des Giardien-ELISA, ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay (Firma Remel Inc., Lenexa, Kansas, USA) untersucht. Zum Ausschluss einer Parvovirose wurde ein Parvovirus-Antigentest SNAP Test® (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) und, bei begründetem Verdacht (Leukopenie, unzureichende Impfung), zusätzlich eine PCR auf Parvoviren durchgeführt.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die nach den Kriterien eines standardisierten Protokolles nicht narkosetolerant waren. Dabei durften die Nierenwerte nicht mehr als zweifach erhöht sein. Ebenfalls durfte der Albuminwert nicht unter 20 g/l liegen. Die Vitalparameter wurden bestimmt und mussten im Bereich der Referenzwerte liegen. Der Puls musste regelmäßig und kräftig sein, die Atemfrequenz bei unter 30 Zügen pro Minute liegen und die Auskultation der Lunge ohne besonderen Befund sein. Die Temperatur musste sich in einem Bereich von 37,5 bis 39,5 °C befinden, die kapilläre Füllungszeit einen Wert von unter zwei Sekunden haben und die Schleimhautfarbe physiologisch rosa sein. Wurde bei der Auskultation des Herzens ein Geräusch festgestellt, so wurde die Herzfunktion vor der Narkose ultrasonographisch beurteilt. Desweiteren durften keine pathologischen Arrhythmien vorliegen. Bis zur Endoskopie musste das Tier ausreichend rehydriert sein und der Hämatokrit wieder im Referenzbereich liegen.

#### 1.1.2. **Kontrollgruppe**

Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um zwölf in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München von Juni 2011 bis März 2012 vorgestellte Hunde, die aufgrund von chronischer Magendarmsymptomatik oder wegen Verdacht auf Fremdkörper endoskopierte wurden. Diese Tiere zeigten über einen Zeitraum von mehr als zwei Wochen in unterschiedlichem Maße Durchfall, Erbrechen, Anorexie oder Gewichtsverlust, jedoch keinen blutigen Durchfall und kein blutiges Erbrechen. Auch diese Tiere durften in den letzten 14 Tagen keine Antibiose erhalten haben.

#### 1.2. **Untersuchungen**

Das Signalement und eine detaillierte Anamnese wurden bei allen Tieren erhoben. Blutuntersuchungen wurden ebenfalls bei jedem Tier durchgeführt.

#### 1.2.1. **Anamnese**

Eine detaillierte Anamnese, mit besonderem Augenmerk auf das Durchfallgeschehen, wurde bei jedem Tier erhoben. So wurden zum einen die Fütterung, zeitnahe Futterwechsel und die Aufnahme von Schnee oder Fremdmaterial notiert. Zum anderen wurde Impf- und Entwurmungsstatus, Auslandsaufenthalte, bisherige Erkrankungen und Medikamentengabe festgehalten. Es wurde die genaue Beschaffenheit des Durchfalls und des Erbrochenen und die Dauer des Geschehens erfragt. Der standardisierte Anamnesebogen befindet sich in Anhang 1.1

#### 1.2.2. **Klinische Untersuchung**

Bei der standardisierten klinischen Untersuchung wurde das Allgemeinbefinden beurteilt und die Farbe, Feuchtigkeit und kapilläre Füllungszeit der Schleimhäute bewertet. Der Hydratationszustand des Tieres wurde anhand der Feuchtigkeit der Schleimhäute und des Hautturgors eingeschätzt. Die peripheren Körperlymphknoten (Lnn.) und das Abdomen wurden palpiert, Puls- und Atemfrequenz bestimmt und Herz und Lunge auskultiert. Der standardisierte Untersuchungsbogen ist in Anhang 1.2 abgebildet.

#### 1.2.3. **Krankheitsaktivitätsindex**

Um den Schweregrad der Erkrankung bei Vorstellung und den Fortschritt der Genesung der Patienten einstufen zu können, wurde bei jedem Patienten täglich ein Krankheitsaktivitätsindex erstellt. Dieser beinhaltet wichtige Krankheitskriterien wie Allgemeinbefinden, Appetit, Häufigkeit des Erbrechens, Kotkonsistenz, Kotabsatzfrequenz und Dehydratationszustand. Dabei wurde jeder Parameter nach einer Punkteskala von 0 – 3 (asymptomatisch - hochgradig) bewertet (Abbildung 1). An jedem Tag des Klinikaufenthaltes wurde von demselben Tierarzt auf diese Weise das Allgemeinbefinden des Tieres beurteilt.



<b>Krankheitsaktivitätsindex</b>				
<b>Name:</b> _____, <b>Patientennummer.:</b> _____, <b>Datum:</b> _____, <b>Tag</b>				
Allgemeinbefinden:	<b>0:</b> normal	<b>1:</b> ggr. reduziert	<b>2:</b> mgr. reduziert	<b>3:</b> hgr. reduziert
Appetit:	<b>0:</b> normal	<b>1:</b> ggr. reduziert	<b>2:</b> mgr. reduziert	<b>3:</b> hgr. reduziert
Erbrechen:	<b>0:</b> kein Erbrechen	<b>1:</b> 1/Tag	<b>2:</b> 2 - 3/Tag	<b>3:</b> > 3/Tag
Kotkonsistenz:	<b>0:</b> normal	<b>1:</b> ggr. weich/Schleim/Blut	<b>2:</b> sehr weich	<b>3:</b> wässrig
Kotabsatzfrequenz:	<b>0:</b> 0 - 1/Tag	<b>1:</b> 2 - 3/Tag	<b>2:</b> 4 - 5/Tag	<b>3:</b> > 5/Tag
Dehydratation:	<b>0:</b> keine	<b>1:</b> < 5 %	<b>2:</b> 5 - 10 %	<b>3:</b> > 10 %
AHDS-Index:	_____	_____	+	_____

**Abbildung 1:** Formblatt zur Beurteilung des Krankheitsaktivitätsindex (ggr.: geringgradig, mgr.: mittelgradig, hgr.: hochgradig, AHDS: akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom)

#### 1.2.4. Blutuntersuchungen

Bei allen Hunden wurde mittels Sysmex XT2000iVet (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) ein Differentialblutbild erstellt und manuell die stabkernigen neutrophilen Granulozyten ermittelt. Mit dem Hitachi 912 Automatic Analyzer<sup>®</sup> (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) erfolgte bei jedem Studienteilnehmer die Analyse der Serumchemie. Ermittelt wurden die Alanin-Aminotransferase (ALT), die alkalische Phosphatase (AP), Bilirubin, Harnstoff und Kreatinin, das Gesamteiweiß und Albumin, sowie die Blutglukose. Blut-pH, Elektrolyte und Laktat wurden mittels des GEM<sup>®</sup> Premier 3000 (Firma Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim bei München, Deutschland) bestimmt.

#### 1.2.5. Endoskopie

Die Gastroduodenoskopie und Kolonoskopie wurde von einem Spezialisten in Innerer Medizin für Kleintiere (Diplomate Internal Medicine des European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals) durchgeführt und beurteilt. Für Hunde über 20 kg wurde hierfür das flexible Gastroskop von Olympus PCF Type 140 L (Firma Olympus Flexible Medizinische Endoskopie, Hamburg, Deutschland) für leichtere Hunde das GIF Type 160 (Firma Olympus Flexible Medizinische Endoskopie, Hamburg, Deutschland) verwendet. Makroskopisch wurden Ösophagus, Magen, Duodenum, Kolon und falls möglich Ileum nach den Standardisierungskriterien der World Small Animal Veterinary

Association (WSAVA) beurteilt. Das Protokoll befindet sich in Anhang 3.

#### **1.2.5.1. Makroskopische Beurteilung**

Der Magendarmtrakt wurde anhand der Standardisierungskriterien der WSAVA beurteilt. Hierfür wird jede Lokalisation (Ösophagus, Magen, Duodenum, Ileum, Zaekum, Kolon) einzeln betrachtet und beurteilt. Es wurden charakteristische Veränderungen, wie Hyperämie, Blutung, Erosion oder Ulzeration, die allen Lokalisationen gemeinsam waren, sowie auch individuelle Veränderungen (Passierbarkeit des Pylorus, Lymphgefäßerweiterung) anhand einer Skala von 0 (physiologisch) bis 3 (hochgradig) beurteilt. Die dabei verwendeten Formulare sind in Anhang 3 zu finden.

#### **1.2.5.2. Biopsieentnahme**

Mittels einer gefensterten Einmalzange ohne Dorn (Firma Wieser GmbH Medizintechnik & Geräte, Egenhofen, Deutschland), wurden aus Magen, Duodenum und Kolon jeweils mindestens sechs Biopsien entnommen. In den Fällen, in denen die Ileozäkalklappe nicht mit dem Endoskop passierbar war, wurden die Biopsien blind aus dem Ileum gewonnen. Die ersten Biopsien aus dem Duodenum, die mit einer neuen Einmalzange steril entnommen wurden, wurden in ein Eppendorfgefäß eingebracht und sofort an das Institut für Bakteriologie und Mykologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München weitergeleitet. Alle weiteren Biopsien wurden aufgefaltet, mit der Schleimhautoberfläche nach oben in eine Kassette auf Schaumstoff gebettet und in 10%-iger Formalinlösung fixiert.

#### **1.2.5.3. Bakteriologische Untersuchungen**

Die Biopsieproben wurden direkt dem Institut für Bakteriologie und Mykologie der Tierärztlichen Fakultät der LMU München übermittelt. Dort erfolgte die Anzucht und Differenzierung der Bakterien.

##### **1.2.5.3.1. Bakterienkultivierung**

Die Biopate wurden auf Schafblutagar und Nährböden für Enterobakterien (Gassner- und Rambachagar) mittels Dreißenausstrich aufgebracht. Zur aeroben Bebrütung wurden die Platten für ein bis drei Tage in einen Brutkasten bei einer Temperatur von 37 °C eingesetzt. Der Sauerstoffausschluss für die anaerobe Anzucht erfolgte mittels der GENbox von bioMérieux, Frankreich. Auch diese Platten wurden für ein bis drei Tage im Brutschrank bei 37 °C untergebracht. Die

Lagerung der Kolonien im Anschluß an die Identifizierung erfolgte bei - 80 °C in einem Kryosystem (Microbank, Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada).

#### 1.2.5.3.2. Quantifizierung des Bakterienwachstums

Eine semiquantitative Beurteilung der Bakterienkulturen erfolgte nach folgendem Schema (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Quantifizierung des Bakterienwachstums**

Befundung	Anzahl der Kolonien (ca. 50 µl)
nach Anreicherung	kein Wachstum im Primärausstrich, Isolat erst nach Anreicherung in Nährbouillon
(+)	1 – 10 Kolonien im Primärausstrich
+	11 – 20 Kolonien im Primärausstrich
++	dicht stehende Kolonien im 1., einzeln stehende im 2. Impfstrich
+++	dicht stehende Kolonien im 2., einzeln stehende im 3. Impfstrich
++++	dicht stehende Kolonien im 3. Impfstrich

#### 1.2.5.4. Differenzierung der Bakterien mittels Massenspektrometrie

MALDI-TOF ist eine Kombination aus Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Massenspektrometrie (TOF bezeichnend für Time of Flight). Dabei wird der Analyt, eingebettet in eine Matrix, durch Laserbeschuss verdampft und gleichzeitig ionisiert. Die dabei entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und mittels Massenspektrometer analysiert.

Dafür wurden von den bebrüteten Nährböden frische Kulturen mit einer Pipette auf einen bestimmten Bereichs des Targets (MSP 96 Polished Steel #224990 oder ground steel #224989) verteilt. Darauf wurde 1 µl Lysat aufgebracht, welches bei Raumtemperatur getrocknet wurde. Anschließend wurden 1 - 2 µl Matrix (2,5-Dihydroxybenzoesäure) aufgetropft und ebenfalls bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Differenzierung wurden die Platten in einen Microflex LT Bruker SN254472.00040 (3.0.182.0) (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) eingebracht.

Zur Speziesidentifikation wurde die Software Biotyper 2.0 SR1 (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) herangezogen. Es wurden die ermittelten Spektren mit einer im System integrierten Referenzdatenbank von Spektren einer großen Anzahl relevanter Bakterien verglichen. Die automatisierte Auswertung der Daten erzeugte dabei einen Zahlenwert (Score value), der Aufschluss über die Validität des Differenzierungsergebnisses gab (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Interpretation der MALDI-TOF-Ergebnisse**

Score value	Interpretation	
	Speziesidentifikation	Genusidentifikation
2,300 – 3,000	hochwahrscheinlich	
2,000 – 2,299	wahrscheinlich	hoch wahrscheinlich
1,700 – 1,999	unsicher	wahrscheinlich
0,000 – 1,699	nicht zuverlässig	nicht zuverlässig

#### 1.2.5.5. Typisierung der Clostridien mittels Polymerase Chain Reaction

Zur Bestimmung der Toxovare der isolierten Clostridien wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Das verwendete Programm ist in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Programm für Clostridien-PCR** (min: Minute, s: Sekunde)

Vorgang	Zeit	Temperatur (°C)
Denaturierung	2 min 30 s	95
Primerhybridisierung	1 min	95
	1 min	55
	1 min 20 s	72
Elongation	2 min	72

Es wurden die Primer nach Baums verwendet (BAUMS et al., 2004). Die Gensequenzen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5: Auflistung der für die Typisierung verwendeten Primer** (bp: Basenpaare)

<b>Alpha-Toxin</b>	
CPA5L (900 bp)	AGT CTA CGC TTGGGA TGG AA
CPA5R	TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC
<b>Beta-1-Toxin</b>	
CPBL (611 bp)	TCC TTT CTT GAG GGA GGA TAA A
CPBR	TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC CA
<b>Epsilon-Toxin</b>	
CPETXL (396 bp)	TGG GAA CTT CGA TAC AAG CA
CPETXR	TTA ACT CAT CTC CCA TAA CTG CAC
<b>Jota-Toxin</b>	
CPIL (293 bp)	AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC
CPIR	CTG CAT AAC CTG GAA TGG CT
<b>Beta-2-Toxin</b>	
CPB2L (200 bp)	CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA
CPB2R	GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA
<b>Enterotoxin</b>	
CPEL (506 bp)	GGG GAA CTT CGA TAC AAG CA
CPER	ACC AGC TGG ATT TGA GTT TAA TG

#### 1.2.6. Histologische Untersuchung

Die in Formalin fixierten Biopsien wurden an das Institut für Tierpathologie der

LMU München übermittelt. Dort erfolgte das Einbetten, Schneiden und Färben der Präparate und die histologische Beurteilung.

#### **1.2.6.1. Bearbeitung der Proben für die histologische Beurteilung**

Die Biopsien wurden direkt nach Entnahme zur Fixation in Formalin verbracht. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Proben entwässert und mit einem Einbettungsautomaten (Autotechnikon, Histomaster Modell 2050/Di, Bavimed, Birkenau, Deutschland) eingebettet. Dazu wurden die Proben 30 Minuten mit Aqua dest. gespült, in aufsteigender Alkoholreihe (2 x 1,5 h 70%-iges Ethanol, 2 x 1,5 h 96%-iges Ethanol, 2 x 1,5 h 100%-iges Ethanol) entwässert, für zwei mal 30 Minuten in Xylol und anschließend für zwei Stunden in Paraffin bei 60 °C (Sherwood Medical, St. Louis, USA) eingebracht.

Die Proben wurden im Anschluss mit Hilfe einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding, Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) zu Paraffinblöcken gegossen. Davon wurden am Rotationsmikrotom (HM 315, Mikrom, Walldorf, Deutschland) 4 - 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (76 x 26 mm, Starfrost, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland Nr. 11250) aufgezogen und für mindestens 24 Stunden bei 40 °C im Trockenschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) getrocknet. Für die anschließenden Färbungen wurden die Schnitte durch eine 15-minütige Inkubation mit Xylol entparaffiniert und mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 96%- und 70%-iges Ethanol) rehydriert.

Angefärbt wurden die Biopate mit einer Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und einer Giemsa-Färbung. Für die HE-Färbung wurden die Biopsien für fünf Minuten in Mayers Hämalaun (Applichen, Darmstadt, Deutschland A0884) eingebracht, daraufhin vier Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert, drei bis fünfmal in 1%-ige Eosin-Lösung eingetaucht und schließlich mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss daran wurden sie in aufsteigender Alkoholreihe (70%-, 96%- und 100%-iges Ethanol für jeweils ca. zwei Sekunden) dehydriert und in Xylol verbracht. Das Eindecken erfolgte mit Coverquick® (Labonord, Mönchengladbach, Deutschland).

Für die Giemsa-Färbung wurden die Proben eine Stunde in Giemsa-Gebrauchslösung (Anhang 5.2.2.1.) eingebracht, anschließend mit Aqua dest. gespült und für eine Sekunde in Essigsäure bis zum Farbumschlag von blau zu rot

getaucht. Danach für zwei Sekunden in 96%-iges Ethanol und für zwei mal zwei Sekunden in 100%-iges Ethanol gehalten, in Xylol verbracht und schließlich mit Coverquick® (Labonord, Mönchengladbach, Deutschland) eingedeckt.

#### 1.2.6.2. Histologische Beurteilung

Die Beurteilung der histologischen Schnitte wurde in Zusammenarbeit mit erfahrenen Pathologen des Instituts für Tierpathologie der LMU München durchgeführt. Dabei wurden die Leitlinien der Gastrointestinal Standardization Group der WSAVA beachtet und die von der Organisation erstellten standardisierten Beurteilungskriterien für Magen, Duodenum und Kolon verwendet. Da für das Ileum bisher noch keine eigenen Kriterien erstellt wurden, die Veränderungen jedoch für die allgemeine Beurteilung des Darmes relevant waren, wurde für die Beschreibung des Ileums ein an das Duodenum angelehntes Protokoll etabliert. Die Anzahl der entnommenen Biopsien und deren Qualität wurden erfasst. Histologisch ausgewertet wurden lediglich Schnitte die mehr als drei Villi besaßen und sowohl Anteile von *Lamina propria* als auch Submukosa besaßen.

#### 1.2.6.3. Immunhistologie für *Clostridium perfringens*

Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte zunächst im Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C getrocknet, anschließend mit Xylol für 15 Minuten entparaffiniert und schließlich in absteigender Alkoholreihe (2 x 100%-iges, 2 x 96%-iges, 1 x 70%-iges Ethanol, 1 x Aqua dest.) rehydriert. Das Blockieren der endogenen Peroxidase wurde mit 1%-igen Wasserstoffperoxid über 15 Minuten durchgeführt. Daraufhin wurde mit Tris Buffer Saline (TBS) bei einem pH 7,6 für zehn Minuten (Anhang 5.2.3.1.) gespült. Zur Verhinderung eines unspezifischen Anfärbens wurden die elektrostatischen Ladungen mittels Ziegennormalserum (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich Nr. 2939149) in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Verwendet wurde ein polyklonaler Antikörper gegen *Clostridium* spp. aus dem Kaninchen (Rabbit Anti *Clostridium* spp. 2119-2701 AbD serotec, Düsseldorf, Deutschland). Es wurde daraufhin mit TBS bei einem pH von 7,6 für zehn Minuten gespült, mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (Polyklonale, Ziegen Anti-Kaninchen Immunglobuline-Antiserum, Dako Glostrup, Dänemark Nr. P0448) für eine Stunde inkubiert und

erneut mit TBS bei einem pH von 7,6 für zehn Minuten gespült. Die enzymhautochemische Darstellung der Peroxidase erfolgte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat und DAB-Gebrauchslösung (Anhang 5.2.3.3.) als Chromogen. Anschließend wurde mit Mayers Hämalaun (Applichem, Darmstadt A0884, Deutschland) für eine Minute gegengefärbt und für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Schließlich wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (1 x 70%-iges, 2 x 96%-iges, 2 x 100%-iges Ethanol) dehydriert, in Xylol verbracht und eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurde Schweinefleisch verwendet, welches zuvor mit aus dieser Studie stammenden Clostridienkulturen beimpft worden war. Für die Negativkontrolle wurde das erwähnte Protokoll verwendet, jedoch ohne Einsatz des Primärantikörpers.

#### **1.2.6.4. Immunhistologie auf Parvovirose**

Für die Immunhistologie auf Parvovirose wurden die Schnitte zunächst im Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 37 °C getrocknet, anschließend mit Xylol für 15 Minuten entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe (2 x 100%-iges, 2 x 96%-iges, 1 x 70%-iges Ethanol, 1 x Aqua dest.) rehydriert. Die endogene Peroxidase wurde über 15 Minuten mit 1%-igem Wasserstoffperoxid blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS bei einem pH von 7,6 für fünf Minuten gespült, für zehn Minuten einer proteolytischen Vorbehandlung mit Proteinase-K bei Raumtemperatur unterzogen und erneut für zehn Minuten mit TBS bei einem pH von 7,6 gespült. Das Absättigen von elektrostatischen Ladungen im Gewebe zur Verhinderung eines unspezifischen Anfärbens erfolgte mittels Kaninchennormalserum (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich Nr. 2939149) in einer Verdünnung von 1:80 für 50 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (Mouse Anti Canine/Feline Parvovirus MCA 2064 AbD serotec, Düsseldorf, Deutschland) inkubiert, erneut für fünf Minuten mit TBS bei einem pH von 7,6 zwischengespült und mit peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (Polyklonale, Kaninchen Anti-Maus Immunglobuline, Dako Glostrup, Dänemark Nr. P0s60) in einer Verdünnung von 1:100 für 45 Minuten inkubiert. Nach fünfminütigem Spülen mit TBS bei einem pH von 7,6 wurde eine DAB-Gebrauchslösung zugegeben und nach fünf Minuten mit Mayers Hämalaun (Applichem, Darmstadt A0884, Deutschland) für eine Minute gegengefärbt. Nach fünfminütigem Spülen unter

Leitungswasser, wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (1 x 70 %-iges, 2 x 96 %-iges, 2 x 100 %-iges Ethanol) dehydriert in Xylol verbracht und schließlich eingedeckt.

## **2. Nachweis von Clostridientoxinen und für Toxin codierende Gene**

In dieser Studie wurde untersucht, wie häufig die Toxine (CPE, Toxin A und B) und die für Toxin codierenden Gene (*cpe*, *tcdB*) von *C. perfringens* und *C. difficile* im Kot von am AHDS erkrankten und von gesunden Hunden vorkommen. Zudem sollte geklärt werden, ob es einen Unterschied hinsichtlich spezifischer Laborparameter, Dauer des stationären Aufenthaltes oder des Krankheitsaktivitätsindex zwischen Patienten mit positivem und negativem Nachweis von Toxinen und Toxin codierenden Clostridien gibt.

### **2.1. Tiere**

Die Patientenpopulation bestand aus Hunden die von 2007 bis 2010 in der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München vorgestellt wurden. Die Gruppe der gesunden Kontrolltiere rekrutierte sich aus den Hunden der Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik.

#### **2.1.1. Patienten**

Bei den Patienten handelte es sich um 54 Hunde, die mit akutem, blutigem Durchfall in der Klinik vorgestellt wurden. Bei allen Tieren konnte trotz eingehender Untersuchungen kein Hinweis auf die Krankheitsursache gefunden werden.

##### **2.1.1.1. Einschlusskriterien**

In die Studie aufgenommen wurden Hunde mit blutigem Durchfall, der seit weniger als drei Tagen bestand. Zusätzlich mussten die Patientenbesitzer einer Studienteilnahme zustimmen.

##### **2.1.1.2. Ausschlusskriterien**

Ausgeschlossen aus der Studie wurden Tiere mit Erkrankungen, die potentiell zu hämorrhagischem Durchfall führen können. Dazu zählten bestimmte Infektionen (Parvovirose, Parasiten), Organversagen (Leber, Niere), Hypoadrenokortizismus, Pankreatitis, Koagulopathien und die Aufnahme von potentiell die



### Magendarmschleimhaut schädigenden Medikamenten.

Es wurde dafür eine genaue Anamnese erhoben, ob die Tiere in den letzten zwei Wochen potentiell die Magendarmschleimhaut schädigende Medikamente wie z. B. nichtsteroidale Antiphlogistika oder Glukokortikoide, erhalten hatten. Tiere, bei denen aufgrund von verlängerten Gerinnungszeiten (Prothrombinzeit > 64,4 s, aktivierte partielle Thrombinzeit > 26,2 s) oder erniedrigter Thrombozytenzahl ( $< 100 \times 10^3/l$ ) eine Hämostasestörung vermutet wurde, wurden nicht als Studienpatienten zugelassen. Die Prothrombinzeit (PT) und aktivierte partielle Thrombinzeit (apTT) wurden mit Hilfe des Coagulometers CL<sup>®</sup> (Firma BE Behnk Elektronik, Norderstedt, Deutschland) ermittelt.

Ein Nierenversagen wurde bei Tieren mit mehr als dreifach erhöhten Nierenwerten (Harnstoff > 24,9 mmol/l, Kreatinin > 351,0  $\mu\text{mol/l}$ ), bei gleichzeitigem Vorliegen eines inadäquat konzentrierten Urins (spezifisches Gewicht < 1,030) vermutet. Als verdächtig für ein Leberversagen wurde die Veränderung von mindestens drei Leberfunktionsparametern angesehen (Serumgallensäuren > 20,0  $\mu\text{mol/l}$ , Albumin < 24,6 g/l, Bilirubin > 4,8  $\mu\text{mol/l}$ , Glukose < 5,4 mmol/l). Hierfür wurde ein Serumprofil mittels Hitachi 912 Automatic Analyzer<sup>®</sup> (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Ebenfalls ausgeschlossen von der Studie wurden Hunde, welche im Ultraschall Hinweise auf eine gastrointestinale Neoplasie (z. B. fokal verdickte Darmwand, aufgehobene Darmwandschichtung, vergrößerte abdominale Lymphknoten) hatten. Eine Pankreatitis wurde mittels einer Ultraschalluntersuchung (inhomogenes, verbreitetes Pankreas, hyperechogenes umliegendes Gewebe) ausgeschlossen. Waren im Ultraschall oder Röntgen Hinweise auf eine Invagination oder einen gastrointestinalen Fremdkörper zu sehen, so war dies ebenfalls ein Ausschlusskriterium. Dafür wurde ein vollständiger Abdomenultraschall von einem erfahrenen Internisten (Diplomate Internal Medicine des European College of Veterinary Internal Medicine – Companion Animals) mit dem LOGIQ P6 (Firma GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA) durchgeführt. Ein Hypoadrenokortizismus wurde bei physiologischen Elektrolyten, einem Stressleukogramm und ohne Vorbericht von Schwäche nicht in Betracht gezogen. Eine Infektion mit Viren oder Parasiten, die zu blutigem Durchfall führen können, machte eine Studienteilnahme ebenfalls

unmöglich. Zum Ausschluss hierfür wurde eine Flotation nach Standardverfahren mittels einer 29,5%-igen Natriumnitratlösung (Firma Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) zum Nachweis von Haken-, Spul- und Peitschenwürmern durchgeführt. Auf Giardien wurde mit Hilfe des Giardien-ELISA, ProSpecT® *Giardia* Microplate Assay (Firma Remel Inc., Lenexa, Kansas, USA) untersucht. Ein Parvovirus-Antigentest und ein Giardien-Antigen-ELISA durchgeführt. Zum Ausschluss einer Parvovirose wurde ein Parvovirus-Antigentest SNAP (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, USA) und, bei begründetem Verdacht (Leukopenie, unzureichende Impfung), zusätzlich eine PCR auf Parvoviren durchgeführt.

#### 2.1.2. **Kontrollgruppe**

Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um 23 gesunde Hunde von Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München. Alle Tiere waren bei der klinischen Untersuchung unauffällig. Keines dieser Tiere hatte in den letzten zwei Monaten gastrointestinale Symptome gezeigt.

### 2.2. **Untersuchungen**

Das Signalement und eine detaillierte Anamnese wurden bei allen Tieren erhoben. Blutuntersuchungen wurden bei allen Tieren durchgeführt.

#### 2.2.1. **Anamnese**

Eine detaillierte Anamnese, mit besonderem Augenmerk auf das Durchfallgeschehen, wurde bei jedem Tier erhoben. So wurden zum einen die Fütterung, zeitnahe Futterwechsel und die Aufnahme von Schnee oder Fremdmaterial notiert. Zum anderen wurde Impf- und Entwurmungsstatus, Auslandsaufenthalte, bisherige Erkrankungen und Medikamentengabe festgehalten. Es wurde die genaue Beschaffenheit des Durchfalls und des Erbrochenen und die Dauer des Geschehens erfragt. Der standardisierte Anamnesebogen befindet sich in Anhang 1.1.

#### 2.2.2. **Klinische Untersuchung**

Bei der standardisierten klinischen Untersuchung wurde das Allgemeinbefinden beurteilt und die Farbe, Feuchtigkeit und kapilläre Füllungszeit der Schleimhäute bewertet. Der Hydrationszustand des Tieres wurde anhand der Feuchtigkeit der Schleimhäute und des Hauturgors eingeschätzt. Die peripheren

Körperlymphknoten (Lnn.) und das Abdomen wurden palpiert, Puls- und Atemfrequenz bestimmt und Herz und Lunge auskultiert. Der standardisierte Untersuchungsbogen ist im Anhang 1.2 abgebildet.

#### 2.2.3. **Krankheitsaktivitätsindex**

Um den Schweregrad der Erkrankung bei Vorstellung und die Genesung des Patienten einstufen zu können, wurde bei jedem Patienten täglich ein Krankheitsaktivitätsindex erstellt. Dieser beinhaltet wichtige Krankheitskriterien wie Allgemeinbefinden, Appetit, Häufigkeit des Erbrechens, Kotkonsistenz, Kotabsatzfrequenz und Dehydratationszustand. Dabei wurde jeder Parameter (Abbildung 1) nach einer Punkteskala von 0 – 3 (asymptomatisch - hochgradig) bewertet. An jedem Tag des Klinikaufenthaltes wurde von demselben Tierarzt auf diese Weise das Allgemeinbefinden des Tieres beurteilt.

#### 2.2.4. **Blutuntersuchungen**

Bei allen Hunden wurde mittels Sysmex XT2000iVet (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) ein Differentialblutbild erstellt und manuell die stabkernigen Neutrophilen ermittelt. Mit dem Hitachi 912 Automatic Analyzer® (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) erfolgte bei jedem Studienteilnehmer die Analyse der Serumchemie. Ermittelt wurden die Alanin-Aminotransferase (ALT), die Alkalische Phosphatase (AP), Bilirubin, Harnstoff und Kreatinin, das Gesamteiweiß und Albumin, sowie die Blutglukose. Blut-pH, Elektrolyte und Laktat wurden mittels des GEM® Premier 3000 (Firma Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim bei München, Deutschland) bestimmt.

#### 2.3. **Nachweis von Toxinen und toxintragenden Genen im Kot**

Die gefrorenen Kotproben wurden in einer Styroporbox auf Trockeneis verpackt. Das Paket wurde für weitere Untersuchungen an das Gastrointestinal Laboratory der Texas A&M University versandt. Die Proben wurden für die Untersuchenden am Gastrointestinal Laboratory der Texas A&M University geblindet und durchmischt. Es bestand keine Möglichkeit die Kotproben der Kontrolltiere von denen der erkrankten Hunde zu unterscheiden.

##### 2.3.1. **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay für Toxinnachweis**

Für den Nachweis von CPE und Toxin A/B von *C. difficile* wurde ein

kommerziell erhältliches Testkit verwendet. Das CPE wurde mit dem CPE-ELISA (TechLab, Blacksburg, VA, USA) nachgewiesen, während für die Toxine A und B das Testkit *C. difficile* Tox A/B II, (TechLab, Blacksburg, VA, USA) Anwendung fand. Die Tests wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde ein drei Millimeter langes Stück geformten Kots oder 50 µl flüssigen Kots mit 200 µl Verdünnungsmittel emulgiert und für zehn Sekunden vermischt. 100 µl der verdünnten Probe wurden auf die polyklonale Antikörper enthaltenden Microassays aufgebracht. Eine positive Reaktion des ELISA wurde mittels Spektralphotometrie ausgewertet. Dabei wurde die Intensität des spektralen Lichtes mit einem Photometer quantitativ bestimmt.

### 2.3.2. Quantitative Polymerase Chain Reaction für Gennachweis

Die Menge an cpe und für *C. difficile* Toxin B codierendes Gen (tcdB) wurden anhand von quantitativen PCR evaluiert. Dabei wurden die in Tabelle 6 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 6: Primer für PCR** (*C. perfringens*: *Clostridium perfringens*, *C. difficile*: *Clostridium difficile*)

Bakterium	qPCR Primer	Sequenz (5' - 3')	Hybridisierungstemperatur (°C)	Referenzen
<i>C. perfringens</i>	CPerf165 F	CGCATAACGTTGAAA GATGG	58	(WISE & SIRAGUSA, 2005)
	CPerf269 R	CCTTGGTAGGCCGTTA CCC		
	CPerf187 F (probe)	FAM- TCATCATTCAACCAAA GGAGCAATCC- TAMURA		
<i>C.-perfringens</i> - Enterotoxin- Gen	cpe F	AACTATAGGAGAACA AAATACAATAG	55	(GURJAR et al., 2008)
	cpe R	TGCATAAACCTTATAA TATACATATTC		
	cpe Pr (probe)	FAM- TCTGTATCTACAACCTG CTGGTCCA-TAMURA		
<i>C. difficile</i>	Forward	TTGAGCGATTTACTTC GGTAAAGA	61	(PENDERS et al., 2005)
	Reverse	TGTACTGGCTCACCTT TGATATTCA		
	probe	FAM- CCACGCGTTACTCACC CGTCCG-TAMURA		
<i>C.-difficile</i> - Toxin-B-Gen	tcdB-F	GGTATTACCTAATGCT CCAAATAG	58	(HOUSER et al., 2010)
	tcdB-R	TTTGTGCCATCATTTT CTAAGC		
	tcdB-P (probe)	FAM- ACCTGGTGTCCATCCT GTTTCCCA-TAMURA		

### **2.3.2.1. *Clostridium-perfringens*-Enterotoxigen**

Die qPCR zum Nachweis von CPE wurde mit einer Gesamtmenge von 10 µl Flüssigkeit durchgeführt. Diese Mischung bestand aus 5 µl TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No Amp Erase® UNG (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA), 2,2 µl Wasser, 0,3 µl von jedem Primer (dies entspricht 300 nM in der Endkonzentration), 0,2 µl der Probe (dies entsprach 200 nM in der Endkonzentration) und 2 µl DNA.

Initial wurde die Mischung bei 94 °C für zehn Minuten inkubiert. Für die Denaturierung wurden 45 Durchgänge über jeweils zehn Sekunden bei 94 °C durchgeführt. Die Primerhybridisierung erfolgte bei 58 °C über 20 Sekunden und die Elongation schließlich bei 70 °C über zehn Sekunden.

### **2.3.2.2. Gen für Toxin B**

Die PCR wurde mit einer Gesamtmenge von 10 µl Flüssigkeit durchgeführt. Diese Mischung bestand aus 5 µl SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland), 2,35 µl Wasser, 0,25 µl jedes Primers (dies entspricht einer Endkonzentration von 250 nM), 0,15 µl der Probe (dies entspricht einer Endkonzentration von 150 nM) und 2 µl DNA. Zunächst wurde für zwei Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend 40 Durchgänge bei 95 °C zur Denaturierung und Elongation durchgeführt.

## **3. Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office 2007 Excel und GraphPad Prism Version 5.04. Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen wurden mit GraphPad Prism ermittelt. Um Unterschiede bei einzelnen Parametern (Blutwerte, Alter, Gewicht) zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde bei Normalverteilung ein ungepaarter t-Test, bei nicht normal verteilten Werten ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Um Unterschiede zusammenhängender Werte festzustellen (Vergleich Dünndarm/Dickdarm im Individuum) wurde bei Normalverteilung ein gepaarter t-Test, bei nicht normal verteilten Werten, ein Wilcoxon-Test durchgeführt. Wenn mehrere Vergleiche unter Verwendung eines Datensatzes durchgeführt wurden, so wurde der P-Wert korrigiert, indem er durch die Anzahl der Vergleiche geteilt wurde (Bonferroni-Korrektur). Um Häufigkeiten, wie die Anzahl der positiven und negativen Kotproben zu vergleichen, wurde ein Fisher`s-Exact-Test durchgeführt.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Endoskopiestudie

Bei den zehn Patienten mit AHDS wurden die endoskopisch sichtbaren Veränderungen ausgewertet. Die Biopsien wurden histologisch beurteilt und bakteriologisch untersucht. Elf Kontrolltiere dienten zum Vergleich der bakteriologischen Befunde.

#### 1.1. Signalement

Das Signalement, sowohl der Patienten als auch der Kontrollgruppe, wurde erfasst und statistisch ausgewertet. Es wurden Alter, Geschlecht, Rasse und Körpergewicht ermittelt.

##### 1.1.1. Studienteilnehmer

Die zehn an der Studie teilnehmenden Hunde waren im Mittelwert 5,5 Jahre alt. Der Median betrug fünf Jahre, wobei 70 % der Tiere zwischen ein und sechs Jahre alt waren. Das Gewicht betrug im Mittel 11,2 kg (Median 11 kg), wobei nur ein Tier mehr als 13 kg wog. Die Geschlechterverteilung war gleichmäßig (männlich 3/10, männlich kastriert 2/10, weiblich 2/10, weiblich kastriert 3/10). Yorkshire Terrier (2/10) und kleine Mischlinge (3/10) waren am häufigsten vertreten. In Tabelle 7 sind die Informationen über das Signalement der Patienten dargestellt.

**Tabelle 7: Signalement Patienten** (m: männlich intakt, mk: männlich kastriert, w: weiblich intakt, wk: weiblich kastriert, kg: Kilogramm)

Patient	Alter (Jahre)	Geschlecht	Rasse	Körpergewicht (kg)
1	3	m	Yorkshire Terrier	2,9
2	5	wk	Mischling	13,0
3	10	w	Mischling	6,1
4	6	w	Jack-Russell Terrier	12,7
5	3	m	Labrador	30,5
6	5	m	Rauhaardackel	7,4
7	10	mk	Westhighland White Terrier	11,0
8	10	mk	Yorkshire Terrier	7,6
9	2	wk	Mischling	4,2
10	1	wk	Miniaustralian Shepherd	11,8

##### 1.1.2. Kontrolltiere

Die elf Kontrolltiere waren im Mittel 8,2 Jahre alt (Median 10) und 27,7 kg (Median 27,7 kg) schwer. Die männlich unkastrierten Tiere waren mit 7/11 neben

zwei männlich kastrierten und zwei weiblich kastrierten überrepräsentiert. Vier der Tiere wurden aufgrund von chronischem Vomitus, drei wegen Verdacht auf Fremdkörperaufnahme und jeweils ein Tier wegen chronischer Diarrhoe, rezidivierender Abdominalschmerzen und Gewichtsverlust endoskopiert. Keines der Tiere zeigte Anzeichen von blutigem Durchfall oder Erbrechen. In Tabelle 8 sind die Informationen über das Signalement der Kontrolltiere dargestellt.

**Tabelle 8: Signalement Kontrolltiere** (m: männlich intakt, mk: männlich kastriert, w: weiblich intakt, wk: weiblich kastriert, kg: Kilogramm, FK: Fremdkörper, FM: Futtermittel)

Kontroll-tier	Alter (Jahre)	Ge-schlecht	Rasse	Gewicht (kg)	Grund der Endoskopie	Diagnose
1	10	m	Dalmatiner	35,8	FKverdacht	FK
2	8	m	Mischling	27,0	Gewichtsverlust	FM-Allergie
3	12	wk	Magyar Vizsla	25,7	Anorexie	Ösophagitis
4	2	m	Malinois	29,2	Vomitus	Gastritis
5	6	m	Mischling	28,4	Vomitus	IBD
6	7	m	Leonberger	62,5	Vomitus	FM-Allergie
7	1	wk	Rhodesian Ridgeback	34,0	Chronische Diarrhoe	Ulzerative Kolitis
8	10	mk	Beagle	18,3	Akutes Erbrechen	FK
9	13	m	Yorkshire Terrier	5,0	Schmerzhaftes Abdomen	Keine Diagnose
10	11	m	Mischling	10,0	FKverdacht	FK
11	10	mk	Jack-Russell Terrier	11,3	Chronisches Erbrechen, Gewichtsverlust	Pylorus-hypertrophie

## 1.2. Anamnese

Eine eingehende Anamnese wurde bei allen Studienteilnehmern erhoben. Bis auf ein Tier waren alle Patienten grundimmunisiert und regelmäßig geimpft, jedoch meist unregelmäßig entwurmt. Ein Gewichtsverlust wurde von keinem der Besitzer beobachtet, jedoch wurde bei 9/10 Patienten von einem Appetitsverlust seit Erkrankungsbeginn berichtet. Die Tiere wurden im Durchschnitt 17 Stunden (Median 12 Stunden) nach Einsetzen der Krankheitsanzeichen in der Klinik vorgestellt. Alle zeigten im Verlauf der Erkrankung Durchfall und Erbrechen. Bei Tier Nummer 4 trat Durchfall erst 12 Stunden nach Vorstellung in der Klinik auf. Bei 5/10 Patienten trat das Erbrechen vor dem Durchfall auf. Das Erbrochene war bei 6/10, der Durchfall bei 10/10 Patienten blutig. Die anamnestischen Informationen sind in Tabelle 9 und 10 zusammengefasst.

### 1.3. **Klinische Untersuchung**

Alle vorgestellten Tiere waren gut genährt und zeigten keine Merkmale eines chronisch kranken Tieres. Die Hälfte der Tiere wies eine erhöhte Herzfrequenz auf. Bei drei der zehn Tiere wurde eine geringgradige bis hochgradige Untertemperatur festgestellt. Ebenso war bei der Mehrheit der Tiere eine Dehydratation (8/10) zu erkennen und ein geringgradig bis hochgradig schmerzhaftes Abdomen (8/10) festzustellen. Ein Tier wies eine verlängerte kapilläre Füllungszeit auf. Die rektale Untersuchung war bei allen Patienten unauffällig. In Tabelle 11 sind die Informationen der klinischen Untersuchung dargestellt, dabei wurden die von der Norm abweichenden Werte rot dargestellt

### 1.4. **Krankheitsaktivitätsindex und Dauer des Aufenthaltes**

Die Tiere wurden im Median für drei Tage (Mittelwert (MW): 3,3 Tage) in der Klinik behandelt. 8/10 Tieren verbesserten sich anhand des Krankheitsaktivitätsindex von Tag 1 auf Tag 2 um über 25 % (MW: 36,8 %). Nur bei einem Tier konnte wenig Verbesserung (7%) und bei einem anderen sogar eine Verschlechterung beobachtet werden. Unter Therapie verschwand meist zuerst das Erbrechen (MW: 1,3 Tage) und die Dehydratation (MW: 1,1 Tage), gefolgt von einer Verbesserung des Allgemeinbefindens (MW: 2,3 Tage) und des Appetits (MW: 2,4 Tage). Am längsten dauerte es bis der Kot wieder geformt war (MW: 3,5 Tage). In Tabelle 12 ist der Score des klinischen Krankheitsaktivitätsindex, welcher täglich während des gesamten stationären Aufenthaltes bestimmt wurde, für jeden einzelnen Patienten dargestellt.



**Tabelle 9: Individuelle Darstellung der anamnestischen Informationen der Patientengruppe** (+: ja, -: nein, nb: nicht bekannt; Durchfallkonsistenz: 1: dickbreiig, 2: dünnbreiig, 3: wässrig, h: Stunde, NSAID: nichtsteroidales Antiphlogistikum)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Schnee gefressen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Futterwechsel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Impfung	+	+	+	+	+	+	nb	+	+	+
Grundimmunisierung	+	+	+	+	+	+	nb	+	+	+
Entwurmung zuletzt (Jahre)	0,5	> 1,0	< 0,5	> 1,0	< 0,5	> 1,0	nb	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0
Appetitsverlust	2	3	2	-	1	3	3	3	3	3
Gewichtsverlust	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Krankheitsbeginn (h)	32	12	7	12	6	10	6	18	36	36
Erbrechen (h) bis Vorstellung	12	6	7	12	3	10	6	18	2	36
Erbrechensfrequenz (x/h)	1,0	1,2	2,2	0,3	1,0	1,2	1,6	0,3	3,0	0,4
Erbrechen blutig	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
Durchfall (h) bis Vorstellung	32	12	5	0	5	10	4	12	36	12
Durchfallfrequenz (x/h)	nb	0,8	1,0	0,0	1,0	1,0	1,3	0,4	nb	0,8
Durchfallkonsistenz	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Durchfall blutig	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Erbrechen vor Durchfall	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+

**Tabelle 10: Zusammenfassung der anamnestischen Informationen der Patientengruppe** (SD: Standardabweichung, Min.: Minimum, Max.: Maximum, h: Stunde)

	Median	Mittelwert	SD	Min.	Max.
Zeit Krankheitsbeginn bis Vorstellung (h)	12	17,5	12,4	6	36
Erbrechen (h) bis Vorstellung	8,5	11,2	9,9	2	36
Erbrechensfrequenz pro h	1,2	1,23	0,90	0,3	3
Durchfall (h) bis Vorstellung	12	14,2	11,7	4	36
Durchfallfrequenz pro h	1,0	0,88	0,27	0,4	1,3

**Tabelle 11: Informationen der klinischen Untersuchung der Patientengruppe** (KFZ: kapilläre Füllungszeit, 0: physiologisch, 1: geringgradig 2: mittelgradig, 3: hochgradig, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens	2	3	2	0	0	2	2	2	1	2	1,6	1,0
Temperatur (°C)	37,2	36,6	38,0	38,1	38,0	37,9	38,2	35,5	38,5	37,8	37,60	0,91
Schleimhautfarbe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
KFZ (s)	> 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2		
Dehydrationszustand (%)	7	7	0	0	5	7	7	7	7	7		
Herzfrequenz pro Minute	140	136	96	128	100	160	123	160	146	92	128,1	25,2
Atemfrequenz pro Minute	20	28	32	28	20	24	24	24	24	28	25,2	4,8
Schmerzhaftigkeit Abdomen	1	2	0	0	1	3	1	3	1	1	1,3	1,0
Rektale Untersuchung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

**Tabelle 12: Krankheitsaktivitätsindex der einzelnen Patienten während des stationären Aufenthaltes** (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Tag 1	11	17	12	6	11	16	16	14	7	15	12,5	3,8
Tag 2	7	13	5	8	1	11	3	13	3	10	7,4	4,3
Tag 3	5	7	0	6	entlassen	5	0	10	0	5	3,8	3,6
Tag 4	entlassen	entlassen	entlassen	1		entlassen	entlassen	9	entlassen	entlassen	1,0	2,8
Tag 5				entlassen				9			0,9	2,8
Tag 6								5			0,5	1,6
Summe	23	37	17	21	12	32	19	60	10	30		

### 1.5. Laborparameter

Es wurden die Ergebnisse aus den Blutuntersuchungen (Blutbild, Blutgasanalyse, Gerinnung und Serumprofil) erfasst.

#### 1.5.1. Blutuntersuchungen

Bei allen Tieren wurden Blutuntersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden für jedes Tier einzeln dokumentiert.

##### 1.5.1.1. Blutbild

Bei den meisten Tieren (8/10) konnte eine geringgradige bis hochgradige Hämokonzentration festgestellt werden. Ebenso war bei 4/10 Tieren eine meist geringgradige in einem Fall mittelgradige Leukozytose zu beobachten. Daran beteiligt waren vorrangig die segmentkernigen neutrophilen Granulozyten, deren Anzahl bei 8/10 Patienten oberhalb des Referenzbereiches lag. Aber auch die Menge der Monozyten war bei 8/10 und die der stabkernigen neutrophilen Granulozyten bei 2/10 Tieren erhöht. In Tabelle 13 sind die Werte der Blutbilduntersuchung jedes einzelnen Patienten und in Tabelle 14 als Zusammenfassung für die ganze Patientengruppe dargestellt.

##### 1.5.1.2. Serumprofil

Bei 3/10 Tieren war eine milde Erhöhung eines Leberenzym zu beobachten. Ein Tier wies ein deutlich erhöhtes Gesamteiweiß und Albumin, sowie eine geringgradig erhöhte Leberenzymaktivität auf. Eine milde Hyperglykämie konnte bei 5/10 Tieren festgestellt werden. In Tabelle 15 sind die Werte der Serumuntersuchung jedes einzelnen Patienten und in Tabelle 16 als Zusammenfassung für die ganze Patientengruppe dargestellt.

**Tabelle 13: Individuelle Darstellung der Blutbild- mit Differentialblutbildresultate der Patienten** (Min.: Minimum, Max.: Maximum, l: Liter)

	Referenzbereich		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Min.	Max.										
Hämatokrit (%)	35	55	71	61	57	52	55	62	67	66	66	49
Leukozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	5,00	16,00	12,90	10,74	18,02	17,97	17,35	11,24	25,61	13,75	9,49	12,77
Monozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,04	0,50	1,29	0,34	0,91	0,49	0,69	0,54	2,14	1,07	0,83	0,63
Lymphozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	1,00	3,60	1,55	2,12	1,09	0,86	1,48	0,96	1,66	1,08	1,05	1,77
Stabkernige neutrophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,00	0,50	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,69	1,80	0,00
Segmentkernige neutrophile Granulozyten (x10 <sup>9</sup> /l)	3,00	9,00	9,29	8,23	16,00	13,41	15,03	9,70	21,75	11,96	4,93	10,31
Eosinophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,04	0,60	0,00	0,04	0,01	0,15	0,14	0,02	0,03	0,04	0,00	0,02
Basophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0	0,04	0	0,01	0,01	0,04	0,01	0,02	0,03	0,02	0,04	0,02
Thrombozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	150	500	357	260	435	407	186	477	381	102	374	220

**Tabelle 14: Zusammenfassung der Blutbild- mit Differentialblutbildresultate der Patientengruppe** (SD: Standardabweichung, Min.: Minimum, Max.: Maximum, Ref.: Referenzbereich)

	Median	Mittelwert	SD	Min.	Max.	< Ref. (%)	> Ref. (%)
Hämatokrit (%)	61,5	60,6	7,2	49	71	0	80
Leukozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	13,33	14,980	4,826	9,49	25,61	0	40
Monozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,76	0,890	0,522	0,34	2,14	0	80
Lymphozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	1,29	1,362	0,414	0,86	2,12	0	0
Stabkernige neutrophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,00	0,360	0,590	0,00	1,80	0	30
Segmentkernige neutrophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	10,31	11,100	3,544	4,93	8,76	0	80
Eosinophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,03	0,045	0,054	0,00	0,15	0	0
Basophile Granulozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	0,02	0,022	0,014	0,00	0,04	0	0
Thrombozyten (x 10 <sup>9</sup> /l)	365,5	319,9	121,3	102	477	10	0

**Tabelle 15: Individuelle Darstellung der Serumwerte der Patientengruppe** (ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: Alkalische Phosphatase, SGS: Serumgallensäuren präprandial, nb: nicht beurteilt, Min.: Minimum, Max.: Maximum)

Parameter	Referenzbereich		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Min.	Max.										
ALT (U/l)	16	91	56	58	21	nb	39	nb	40	69	42	107
AP (U/l)	11	110	84	43	56	nb	57	nb	409	349	58	79
Bilirubin (mmol/l)	0,0	4,8	4,9	4,2	2,8	nb	3,3	nb	2,8	1,7	2,5	4,2
SGS (µmol/l)	0,0	18,5	nb	nb	nb	nb	nb	nb	7,0	nb	1,0	1,0
Gesamteiweiß (g/l)	48,0	76,0	44,8	48,5	61,8	nb	63,3	nb	102,1	49,2	57,3	49,0
Albumin (g/l)	25,0	44,0	27,1	34,8	34,2	nb	36,2	nb	58,4	34,4	39,8	29,2
Harnstoff (mmol/l)	3,3	8,3	5,3	4,2	8,2	3,7	3,8	5,7	14,6	9,4	6,8	8,2
Kreatinin (µmol/l)	31,8	117,0	44,0	63,0	54,0	44,2	84,0	< 42,0	157,0	45,0	45,0	54,0
Glukose (mmol/l)	3,3	6,3	6,9	5,8	7,0	5,7	7,0	6,1	8,5	6,4	4,3	5,1
Natrium (mmol/l)	139	163	148	144	150	143	143	143	141	142	151	143
Kalium (mmol/l)	3,8	5,5	4,0	5,5	4,1	3,7	4,5	5,0	5,1	3,8	5,2	4,5

**Tabelle 16: Zusammenfassung der Serumwerte der Patientengruppe** (ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: alkalische Phosphatase, SGS: Serumgallensäuren präprandial, SD: Standardabweichung, Min.: Minimum, Max.: Maximum, Ref.: Referenzbereich l: Liter)

Parameter	Median	Mittelwert	SD	Min	Max.	< Ref. (%)	> Ref (%)
ALT (U/l)	49	54,0	25,9	21	594	0	10
AP (U/l)	68,5	141,9	147,8	43	409	0	20
Bilirubin (mmol/l)	3,1	3,30	1,07	1,7	4,9	0	0
SGS (µmol/l)	1,0	3,00	3,50	1,0	7,0	0	0
Gesamteiweiß (g/l)	53,3	59,50	18,51	44,8	102,2	0	10
Albumin (g/l)	34,6	36,76	9,60	27,1	58,4	0	10
Harnstoff (mmol/l)	6,2	7,00	3,34	3,7	14,6	0	20
Kreatinin (µmol/l)	54,0	65,58	36,64	44,0	157,0	0	10
Glukose (mmol/l)	6,2	6,27	1,19	4,3	8,5	0	50
Natrium (mmol/l)	143,5	145,3	3,8	141	151	0	0
Kalium (mmol/l)	4,5	4,57	0,62	3,8	5,5	0	0

### 1.5.2. Bakteriologische Untersuchungen

Bei 7/10 Studienteilnehmern und 8/11 Kontrolltieren konnten Bakterien angezüchtet werden. Bei einem Tier aus der Patientengruppe erfolgte keine bakteriologische Untersuchung.

#### 1.5.2.1. Studienteilnehmer

Aus 6/9 angezüchteten Duodenalbiopsien konnte *C. perfringens* in unterschiedlichen Mengen isoliert werden. Daneben wuchsen bei einzelnen Patienten bis zu drei weitere Bakterienstämme. Es handelte sich vor allem um fakultative Anaerobier (*Escherichia coli* (*E. coli*), Streptokokken, Staphylokokken, Corynebakterien, Pasteurellen) und Anaerobier (Enterokokken), aber auch vereinzelt aerobe Bakterien (Pseudomonaden, Stenotrophomonaden, Neisserien). In Tabelle 17 sind alle Keime, die bei der bakteriologischen Untersuchung der Duodenalbiopsien isoliert wurden, aufgelistet.

#### 1.5.2.2. Kontrolltiere

Bei nur einem Tier konnte *C. perfringens* in geringer Menge aus dem Duodenum isoliert werden. Bei diesem Patienten handelte es sich um ein Tier mit einem Fremdkörper. Bei 3/11 Tieren erfolgte keinerlei Bakterienwachstum. Die restliche Flora bestand hauptsächlich aus fakultativen Anaerobiern. In Tabelle 18 sind alle Keime, die bei der bakteriologischen Untersuchung der Duodenalbiopsien isoliert werden konnten, individuell für jedes Kontrolltier aufgelistet.

### 1.5.3. Serotypisierung

Bei 4/6 isolierten *C.-perfringens*-Stämmen konnte *cpe* nachgewiesen werden. Dabei wurde das *cpe* in allen Fällen auf dem Plasmid gefunden. Bei denselben vier Patienten wurde eine schwach positive Reaktion für das Gen, welches das Alpha-Toxin (*cpa*) codiert, festgestellt. Bei 2/11 Proben konnte keinerlei Toxigen gefunden werden. In Tabelle 19 sind die PCR-Ergebnisse für den genetischen Nachweis der fünf Haupttoxine und des Enterotoxins individuell für die Patienten 2, 3, 4, 5, 8, und aufgelistet. Nur bei diesen Patienten war eine Anzucht von *C. perfringens* aus der Biopsie möglich.

**Tabelle 17: Bakteriologische Untersuchung der Duodenalbiopsien der Patientengruppe** (nd: nicht durchgeführt, *C. perfringens*: *Clostridium perfringens*, *E. coli*: *Escherichia coli*, spp.: species, -: kein Wachstum, (+): 1 – 10 Kolonien im Primärstrich, +: 11 – 20 Kolonien im Primärstrich, ++: dicht stehende Kolonien im 1., einzeln stehende im 2. Impfstrich, +++: dicht stehende Kolonien im 2., einzeln stehende im 3. Impfstrich )

Bakterienspezies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>C. perfringens</i>	nd	+++	(+)	+	(+)	-	-	+++	-	+
<i>E. coli</i>	nd	++	(+)	(+)	-	-	+	+	-	-
Alpha-hämolysierende Streptokokken	nd	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	nd	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Pasteurella canis</i>	nd	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	nd	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus</i> spp.	nd	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	nd	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Corynebacter</i> spp.	nd	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neisseria</i> spp.	nd	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-

**Tabelle 18: Bakteriologische Untersuchung der Duodenalbiopsien der Kontrolltiere** (*E. coli*: *Escherichia coli*, spp.: species, -: kein Wachstum, (+): 1 – 10 Kolonien im Primärstrich, +: 11 – 20 Kolonien im Primärstrich, ++: dicht stehende Kolonien im 1., einzeln stehende im 2. Impfstrich, +++: dicht stehende Kolonien im 2., einzeln stehende im 3. Impfstrich)

Bakterienspezies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-
<i>E. coli</i>	(+)	+	(+)	++	-	(+)	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-
Aerobe hämolysierende Sporenbildner	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella</i> spp.	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-

**Tabelle 19: Toxingenbestimmung bei *Clostridium perfringens*** (neg: negativ, pos: positiv)

Toxin	2	3	4	5	8	10
Alpha-Toxin	neg	neg	fraglich	fraglich	fraglich	fraglich
Beta-1-Toxin	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Beta-2-Toxin	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Epsilon-Toxin	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Jota-Toxin	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Enterotoxin	neg	neg	pos	pos	pos	pos



### 1.6. Endoskopie

Bei allen zehn Patienten wurde die Endoskopie anhand der Standardisierungskriterien der WSAVA beurteilt. Dabei wurden Ösophagus, Magen, Duodenum, Kolon, Zäkum und Ileum getrennt evaluiert.

#### 1.6.1. Ösophagus

Bei 6/10 Tieren war der Ösophagus makroskopisch vollkommen unauffällig. Bei 4/10 Tieren waren leichte Veränderungen in Form einer milden Hyperämie und Verfärbungen sichtbar. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse der endoskopischen Beurteilung der Ösophagusschleimhaut individuell für jeden einzelnen Patienten aufgeschlüsselt.

**Tabelle 20: Endoskopische Beurteilung des Ösophagus** (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig)

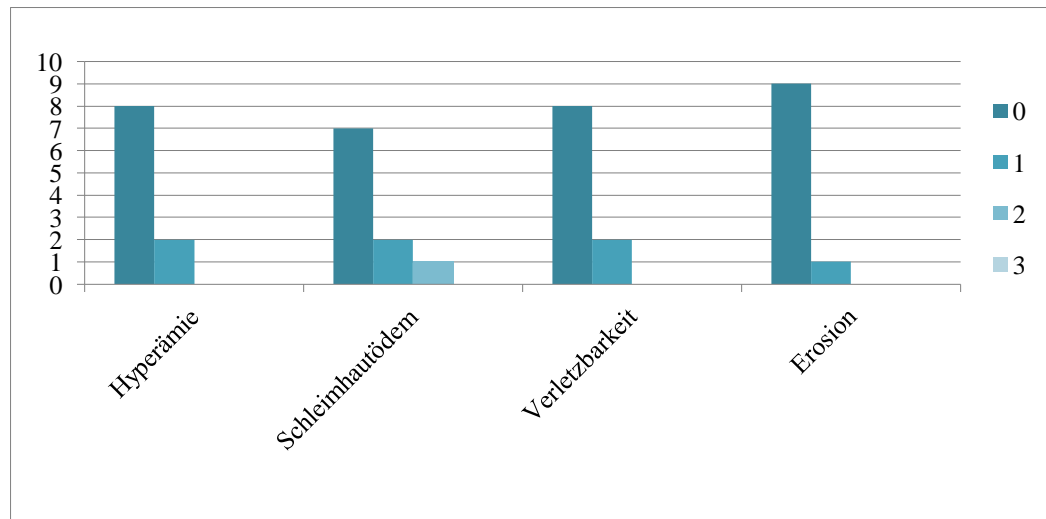
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Hyperämie/Vaskularität	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0,5	0,7
Verfärbungen	0	1	0	0	0	0	2	1	0	1	0,5	0,7
Verletzbarkeit	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Blutung	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Erosion/Ulzeration	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
<b>Summe</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>		

#### 1.6.2. Magen

Bei den meisten Patienten (7/10) zeigte sich der Magen ebenfalls vollkommen physiologisch. Lediglich bei drei Patienten konnte ein geringgradiges bis mittelgradiges Schleimhautödem, sowie bei zweien eine geringgradig vermehrte Rötung und eine erhöhte Verletzbarkeit festgestellt werden. Bei keinem der Tiere war eine Blutung zu sehen. Die Inflation des Magens war bei allen Tieren möglich. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der endoskopischen Beurteilung der Magenschleimhaut individuell für jeden einzelnen Patienten aufgeschlüsselt. Eine Zusammenfassung der endoskopischen Veränderungen des Magens ist in Abbildung 2 dargestellt.

**Tabelle 21: Endoskopische Beurteilung des Magens** (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Hyperämie/Vaskularität	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0,2	0,4
Schleimhautödem	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0,4	0,7
Verletzbarkeit	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0,2	0,4
Erosion/Ulzeration	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,1	0,3
<b>Summe</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		



**Abbildung 2:** In dieser Abbildung sind die endoskopischen Veränderungen des Magens für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen in Schweregrade unterteilt aufgeführt (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten mit der jeweiligen Veränderung angegeben.

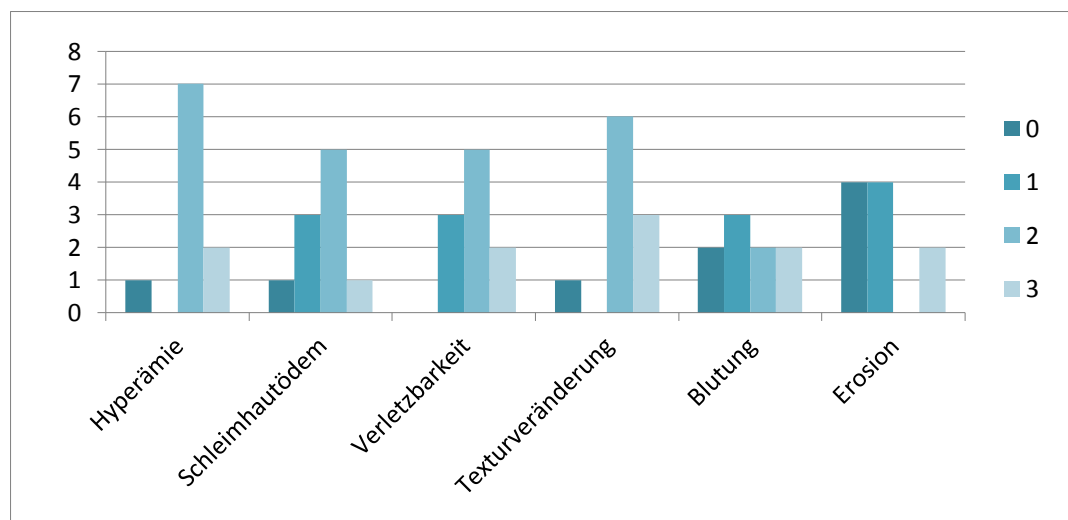
### 1.6.3. Duodenum

Makroskopisch waren die deutlichsten Veränderungen im Duodenum mit einem Mittelwert von 1,63 zu sehen. Bei fast allen Tieren (9/10) waren eine meist mittelgradige bis hochgradige Hyperämie oder erhöhte Vaskularität, ein in unterschiedlichem Maße ausgeprägtes Schleimhautödem und Texturveränderungen zu beobachten. Ebenso wurden bei den meisten Tieren Blutungen und Erosionen festgestellt. Alle Tiere wiesen eine verletzlichere Schleimhautoberfläche auf, die auch bei leichter Irritation mit dem Endoskop sofort zu bluten begann. Insgesamt präsentierten sich jedoch die makroskopischen Veränderungen individuell sehr unterschiedlich. Während Patient Nr. 3 eine Höchstpunktzahl von 18 aufgrund hochgradiger Veränderungen in jeder Lokalisation erreichte, präsentierten sich Nr. 1 und Nr. 10 mit 5 und 6 Punkten mit eher milden Veränderungen. Alle Einzelbewertungen sind in Tabelle 22

aufgelistet. Eine Zusammenfassung der endoskopischen Veränderungen des Duodenums ist in Abbildung 3 dargestellt. In Abbildung 7 ist das Duodenum von Patient Nr. 4 zu sehen.

**Tabelle 22: Endoskopische Beurteilung des Duodenums** (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Hyperämie/Vaskularität	2	0	3	2	2	2	2	3	2	2	2,0	0,8
Schleimhautödem	0	2	3	1	2	2	2	1	2	1	1,5	0,8
Verletzbarkeit	3	2	3	2	2	2	1	2	1	1	1,9	0,7
Texturveränderung	0	2	3	2	3	2	2	3	2	2	1,8	0,9
Blutung	0	1	3	2	1	1	0	3	2	0	1,3	1,2
Erosion/Ulzeration	0	1	3	2	1	1	0	3	2	0	1,3	1,2
<b>Summe</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>9,8</b>	



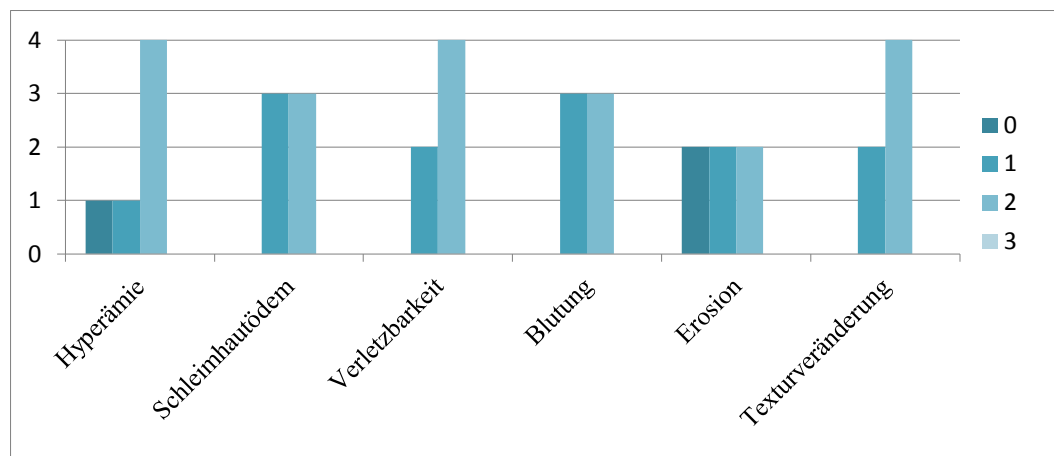
**Abbildung 3:** In dieser Abbildung sind die endoskopischen Veränderungen des Duodenums für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen in Schweregrade unterteilt aufgeführt (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten angegeben.

#### 1.6.4. Ileum

Aufgrund der geringen Körpergröße mancher Probanden konnte nur bei 6/10 Tieren das Ileum begutachtet und beurteilt werden. Im Ileum waren bei allen 6 Tieren Veränderungen sichtbar. Alle Einzelbewertungen sind in Tabelle 23 aufgelistet. Eine Zusammenfassung der endoskopischen Veränderungen des Ileums ist in Abbildung 4 dargestellt.

**Tabelle 23: Endoskopische Beurteilung des Ileums** (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig, nd: nicht durchgeführt)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Hyperämie/Vaskularität	nd	0	1	nd	2	2	nd	2	2	nd	1,5	0,8
Schleimhautödem	nd	2	1	nd	2	2	nd	1	1	nd	1,5	0,5
Verletzbarkeit	nd	1	2	nd	2	2	nd	1	2	nd	1,7	0,5
Blutung	nd	1	2	nd	2	1	nd	1	2	nd	1,5	0,5
Erosion/Ulzeration	nd	0	1	nd	2	1	nd	2	2	nd	1,3	0,9
Texturveränderung	nd	2	2	nd	1	1	nd	2	2	nd	1,7	0,5
<b>Summe</b>		<b>6</b>	<b>9</b>		<b>11</b>	<b>9</b>		<b>9</b>	<b>11</b>			



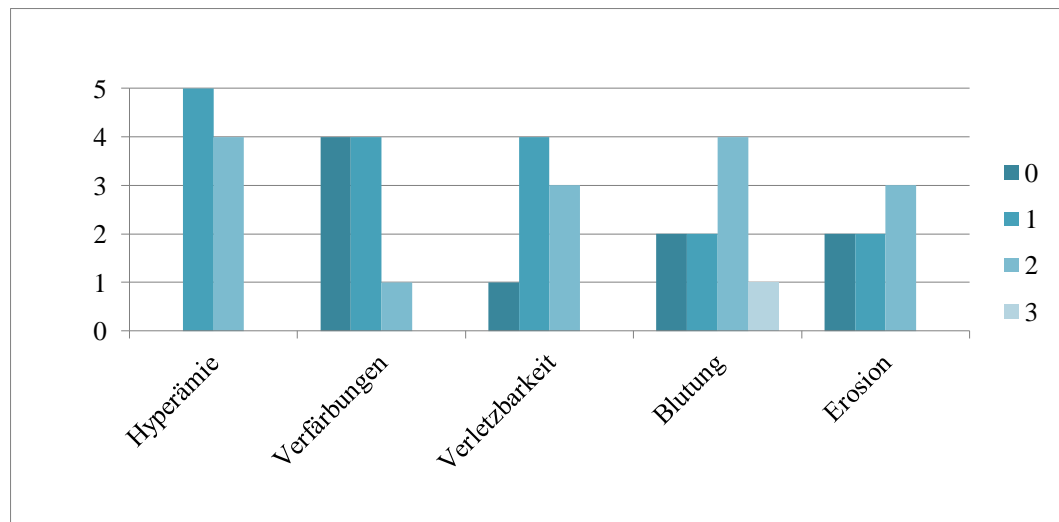
**Abbildung 4:** In dieser Abbildung sind die endoskopischen Veränderungen des Ileums für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen in Schweregrade unterteilt aufgeführt (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten angegeben.

#### 1.6.5. Kolon

Bei 9/10 Hunden wurde eine Kolonoskopie durchgeführt. Aufgrund von Instabilität während der Narkose wurde bei 1/10 Hunden auf eine Kolonoskopie verzichtet. Bei einem Tier war eine vollständige Beurteilung aufgrund der schlechten Sicht auf die mit Kot bedeckte Oberfläche nicht möglich. Alle Einzelbewertungen sind in Tabelle 24 aufgelistet. Eine Zusammenfassung der endoskopischen Veränderungen des Kolons ist in Abbildung 5 dargestellt. Die Veränderungen des Kolons von Patient Nr. 4 sind in Abbildung 7 zu sehen.

**Tabelle 24: Endoskopische Beurteilung des Kolons** (MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig, nd: nicht durchgeführt, nb: nicht beurteilbar)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Hyperämie/Vaskularität	1	1	2	2	1	1	nd	1	2	2	1,3	0,7
Verfärbungen	0	1	0	2	0	1	nd	0	1	1	0,7	0,7
Verletzbarkeit	2	0	2	nb	2	1	nd	1	1	1	1,3	0,7
Blutung	2	0	2	3	2	0	nd	1	2	1	1,4	1,0
Erosion/Ulzeration	1	0	2	nb	2	0	nd	2	1	1	1,1	0,8
<b>Summe</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>3</b>		<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5,8</b>	



**Abbildung 5:** In dieser Abbildung sind die endoskopischen Veränderungen des Kolons für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen in Schweregrade unterteilt aufgeführt (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten angegeben.

### 1.7. Histologische Veränderungen

Insgesamt wurden 223 Biopsien aus verschiedenen Lokalisationen entnommen und in Formalin fixiert. Die Schnitte wurden von erfahrenen Pathologen des Institutes für Tierpathologie der LMU streng nach den Richtlinien der WSAVA interpretiert.

#### 1.7.1. Magen

Es wurden 69 Biopsien (im Durchschnitt 6,9/Tier) von allen zehn Tieren aus Fundus und Pylorus entnommen. Davon entsprachen 63 den von der WSAVA geforderten Qualitätskriterien.

Im Magen wurden keinerlei akute Veränderungen, welche man im Rahmen der vorberichtlich erwähnten klinischen Symptomatik erwarten würde, z. B. in Form



**Abbildung 6:** Im Duodenum von Patient Nr. 4 ist deutlich eine Texturveränderung zu erkennen. Die Schleimhaut stellt sich ödematös und hyperämisch dar und blutet bei Manipulation vermehrt.



**Abbildung 7:** Der Ileozäkalkbereich von Patient Nr. 4 weist eine vermehrte Hyperämie und Vaskularität auf. Bei Entnahme der Biopsien wurde die vermehrte Verletzbarkeit der Schleimhaut deutlich.

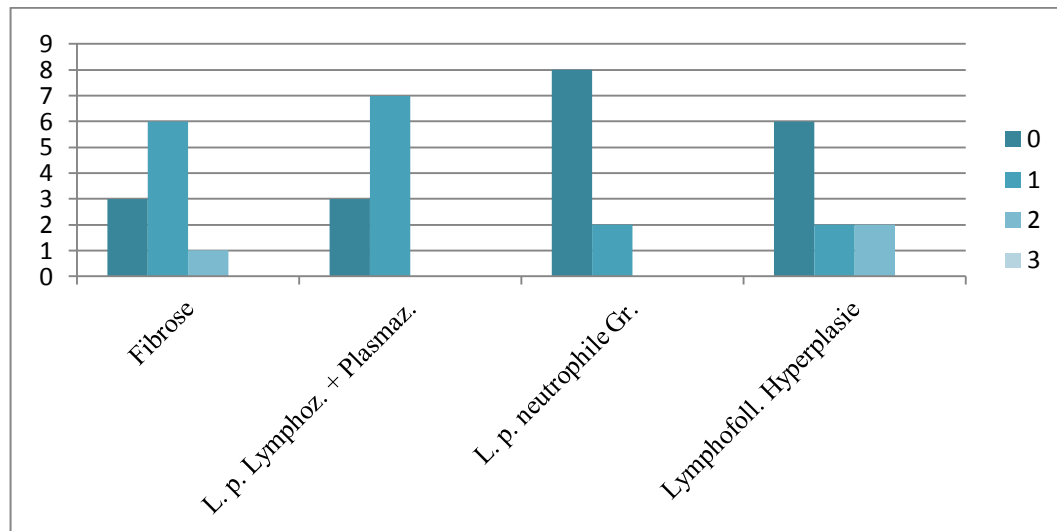
von Zerstörung des Oberflächen- oder Drüsenepithels, beobachtet. Die Biopsien aus dem Magen waren bis auf chronische Veränderungen im Sinne einer diffusen lymphoplasmazellulären Infiltration (8/10), teils mit begleitender Fibrosierung (7/10) der *Lamina propria* unauffällig. Der Grad der Fibrosierung reichte von einer geringgradig, betont subepithelialen Fibrose bis hin zu einer mittelgradig, diffusen interglandulären Fibrosierung mit Ausbildung sogenannter Drüsennester.

Außerdem konnten bei 6/10 Tieren lymphozytäre Aggregate nachgewiesen werden. Bei 9/10 Tieren wurden spirillenförmige Bakterien gesehen, welche sich überwiegend im oberflächlichen Schleim und in den Magengrübchen, vereinzelt auch in den Drüsenlumina und in den Belegzellen befanden. Bei 5/10 Tieren waren sie in moderater, bei 4/10 nur in geringer Menge nachzuweisen. Bei insgesamt 9/10 Patienten wurde eine chronische Gastritis diagnostiziert, die bei 6/10 Tieren durch eine Fibrosierung und bei 3/10 Tieren durch eine lymphfollikuläre Hyperplasie charakterisiert war.

In der nachfolgenden Tabellen 25 sind die histologischen Veränderungen anhand der WSAVA-Kriterien für jedes Tier einzeln dargestellt. Eine Zusammenfassung der histologischen Beurteilung des Magens ist in Abbildung 8 zu sehen.

**Tabelle 25: Histologische Beurteilung des Magens** (L. p.: *Lamina propria*, Lymphoz.: Lymphozyten, Plasmaz.: Plasmazellen, Gr. Granulozyten, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig., 3: hochgradig, grau hinterlegt: Anzeichen chronischer Veränderungen (Da diese keine Relevanz für die akute Symptomatik haben, gingen sie nicht in die Gesamtbewertung des Einzeltieres mit ein.)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Fibrose	1	0	1	1	1	0	1	2	1	0	0,8	0,6
L. p. Lymphoz + Plasmaz.	1	0	1	1	1	1	0	1	1	2	0,9	0,6
L. p. neutrophile Gr.	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0,2	0,4
Lymphofollikuläre Hyperplasie	1	0	0	0	1	1	0	2	1	2	0,8	0,8
Spirillen	++	++	++	+	+	++		+	++	+		
<b>Summe</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>		



**Abbildung 8:** In dieser Abbildung sind die histologischen Veränderungen des Magens für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen in Schweregrade unterteilt aufgeführt (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten angegeben. (L. p.: *Lamina propria*, Lymphoz.: Lymphozyten, Gr.: Granulozyten, Lymphofoll.: Lymphofollikuläre)

#### 1.7.2. Duodenum

Im Duodenum wurden 97 Biopsien (im Durchschnitt 9,7/Tier) von allen Patienten entnommen. Davon waren 64 (im Durchschnitt 6,4/Tier) auswertbar. Es wurden bei 9/10 Tieren akute Veränderungen der Duodenalschleimhaut nachgewiesen. Die Veränderungen dieses Darmabschnittes wurden unterschieden in Läsionen a) im Bereich der Zotten, b) im Bereich des Kryptepithels und c) in der *Lamina propria*. Insgesamt wurde bei 8/10 Tieren ein Untergang des Zotten- und Kryptepithels nachgewiesen. Veränderungen der Zotten fanden sich in Form von Zottenspitzennekrosen sowie Nekrosen ganzer Zotten (Abbildungen 10 und 11). Desweiteren wurden häufig Zottenverkürzungen und -fusionen nachgewiesen (6/10). Im Bereich der Krypten waren akute Epitheluntergänge, teils mit beginnender entzündlicher Abraumreaktion zu finden. Eine Kryptepitheldegeneration war an einer teils hochgradigen Abflachung, einer verringerten Anzahl von Zellen, sowie an einer vermehrten Basophilie des Zytoplasmas erkennbar. Bei drei Tieren wurde eine Dilatation der Krypten gefunden. Weitere Befunde waren eine deutliche Ödematisierung der *Lamina propria* (2/10), eine Hyperämie insbesondere der Zottenspitzen (6/10) und herdförmige Einblutungen in die *Lamina propria*. Erythrozyten und Fibrin wurden im Darmlumen (6/10) gefunden.

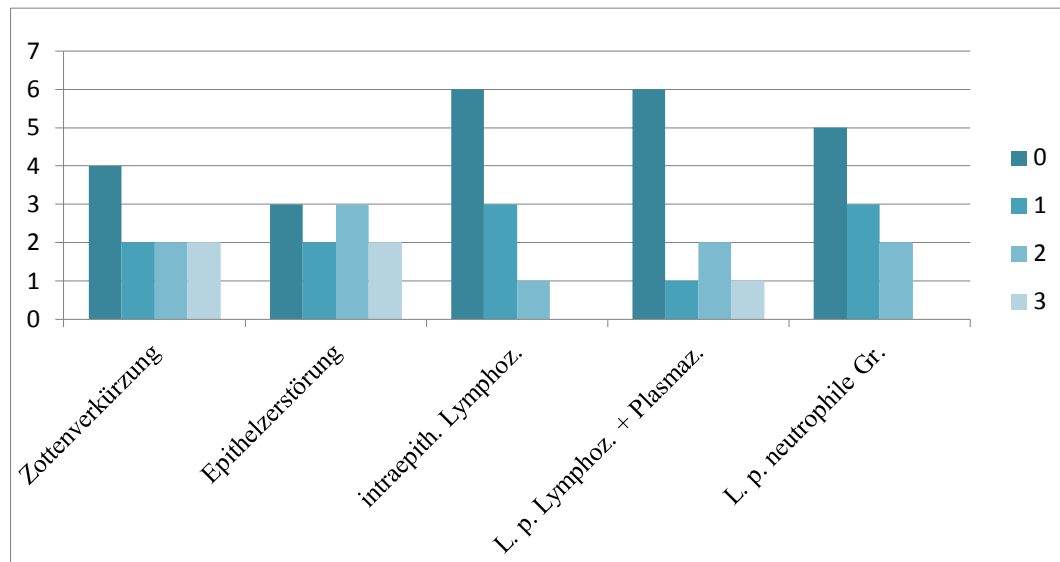


Ein vermehrtes Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen (5/10), eosinophilen Granulozyten (1/10), sowie Mastzellen (4/10) war in der *Lamina propria* zu beobachten. Zusätzlich war diese Darmschicht in unterschiedlicher Ausprägung mit neutrophilen Granulozyten (7/10) infiltriert, welche vor allem um die nekrotischen Areale, aber auch diffus in der *Lamina propria* verteilt waren. Eine erhöhte Anzahl intraepithelialer Lymphozyten wurde bei 2/10 Tieren nachgewiesen.

Der Ausprägungsgrad der akut entzündlichen und nekrotischen Duodenalveränderungen variierte zwischen den einzelnen Tieren sehr stark. Neben geringgradigen (4/10) fanden sich mittelgradige (3/10) und hochgradige Veränderungen (3/10). In Tabelle 26 sind die histologischen Auffälligkeiten des Duodenums dargestellt. Eine Zusammenfassung der histologischen Läsionen des Duodenums ist in Abbildung 9 dargestellt. In den Abbildungen 10, 11 und 12 sind die charakteristischen histologischen Veränderungen der Duodenalschleimhaut zu sehen.

**Tabelle 26: Histologische Beurteilung des Duodenums** (L. p.: *Lamina propria*, Lymphoz.: Lymphozyten, Plasmaz.: Plasmazellen, Gr.: Granulozyten MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig; grau hinterlegt: Anzeichen chronischer Veränderungen - da diese Kriterien keine Relevanz für die akute Symptomatik haben, gingen sie nicht in die Gesamtbewertung des Einzeltieres mit ein)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Zottenverkürzung	1	2	0	0	0	1	2	3	0	3	1,2	1,23
Epithelzerstörung	2	3	0	1	0	1	2	3	1	2	1,5	1,08
Kryptdilatation	0	2	0	0	0	1	2	2	3	2	1,2	1,14
Lymphgefäßerweiterung	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1,2	0,42
Schleimhautfibrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
Intraepitheliale Lymphoz.	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0,3	0,67
L. p. Lymphoz. + Plasmaz.	1	2	2	0	1	0	0	1	0	0	0,7	0,82
L. p. eosinophile Gr.	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,1	0,32
L. p. neutrophile Gr.	1	1	1	0	0	0	3	1	2	1	1,0	0,9
<b>Summe</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>3,7</b>	



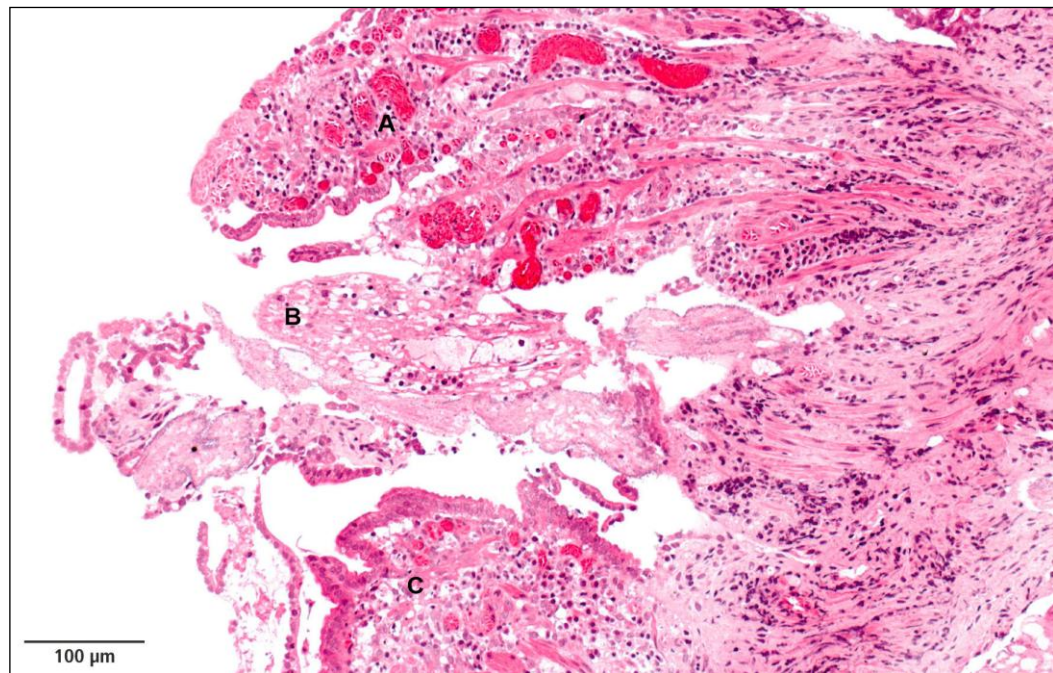
**Abbildung 9:** In dieser Abbildung sind die histologischen Veränderungen des Duodenums für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen in Schweregrade unterteilt aufgeführt (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig), auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten angegeben. (intraepith.: intraepithelial, Lymphoz.: Lymphozyten, L. p.: *Lamina propria*, Plasmaz.: Plasmazellen, Gr.: Granulozyten)

### 1.7.3. Ileum

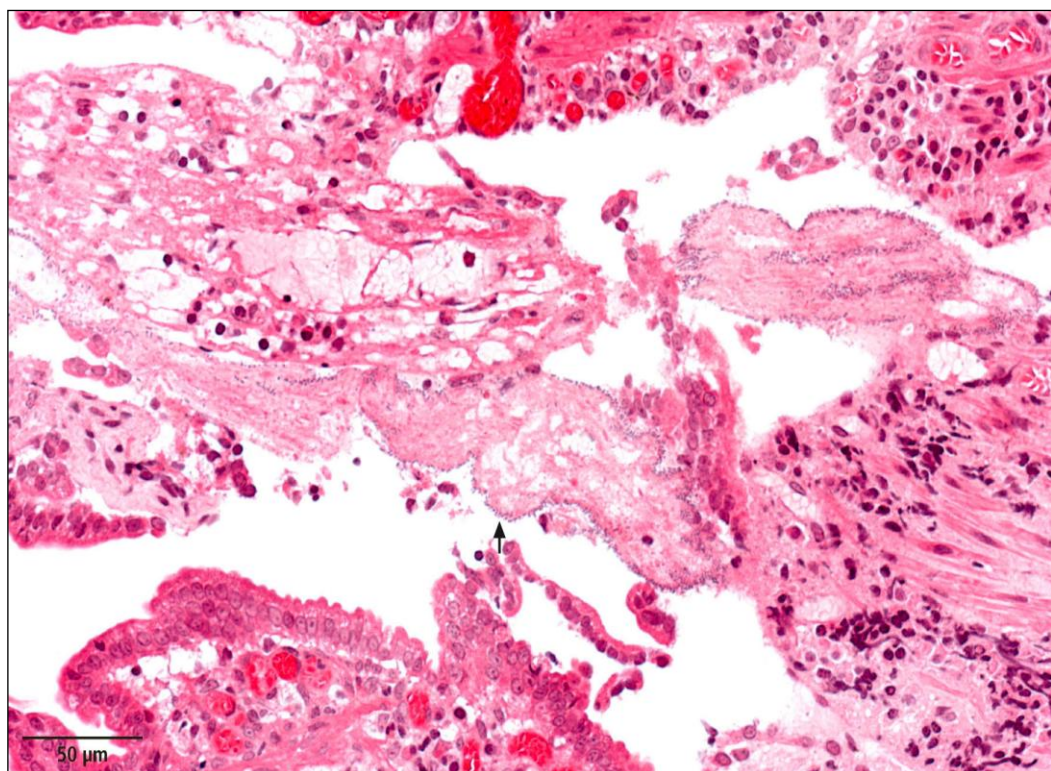
Im Ileum wurden 36 Biopsien (MW 4,5/Tier) von acht Tieren entnommen. 29 der Biopsien (MW 3,6/Tier) waren für die histologische Untersuchung brauchbar.

Die morphologischen Veränderungen der Biopsien aus dem Ileum entsprachen weitestgehend denen der Duodenalbiopsien. Epitheluntergänge im Bereich der Zotten und zum Teil der Krypten wurden bei 6/8 Tieren nachgewiesen. 7/8 Tiere zeigten eine deutliche Zottenverkürzung und -fusion. Die *Lamina propria* wies bei fünf Hunden eine deutliche Ödematisierung auf, bei dreien herdförmige Einblutungen und bei einem Patienten eine Hyperämie. Des Weiteren wurde bei vier Tieren eine Erweiterung der Zottenzentralkanäle und bei dreien eine deutliche Dilatation der Krypten beobachtet.

In der *Lamina propria* wurde bei 7/8 Hunden eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten gesehen. Bei 2/8 Patienten war diese Darmschicht mit eosinophilen Granulozyten und bei 1/8 Tieren mit Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert.

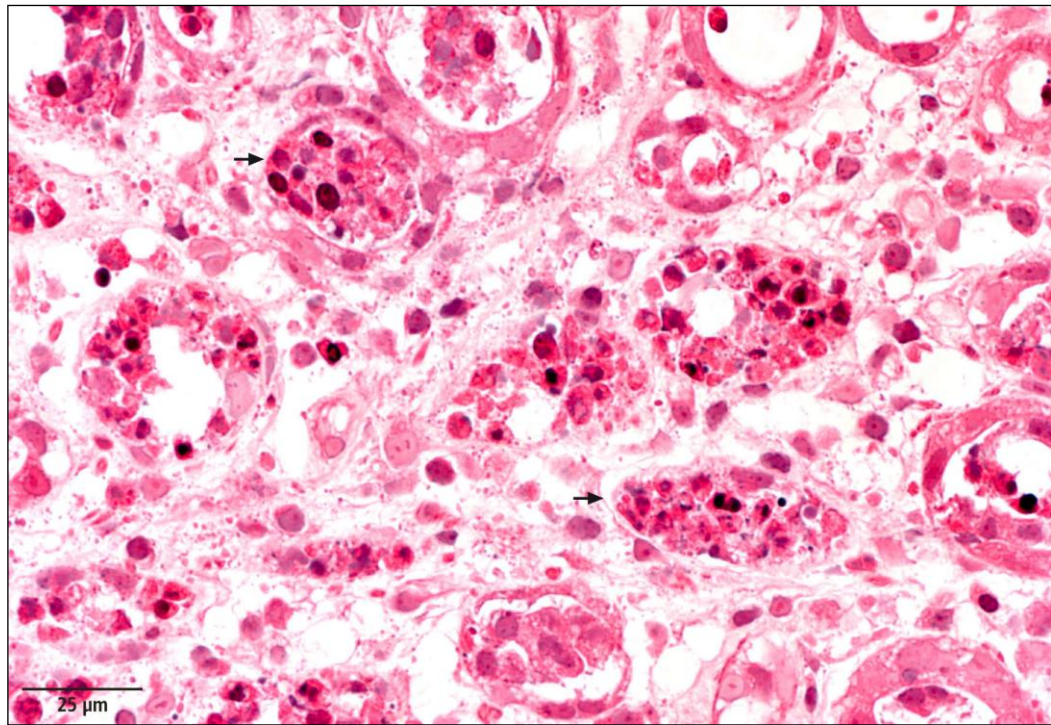


**Abbildung 10:** Duodenum von Patient Nr. 8 in einer HE-Färbung: A: Hyperämie in der Zottenspitze, zerstörtes Oberflächenepithel; B: vollständige Zottennekrose; C: hochgradige Zottenverkürzung.



**Abbildung 11:** Vorherige Abbildung von Patient Nr. 8 in Vergrößerung. Zu sehen ist eine Zottennekrose mit oberflächlicher, hochgradiger bakterieller Besiedlung (Pfeil).



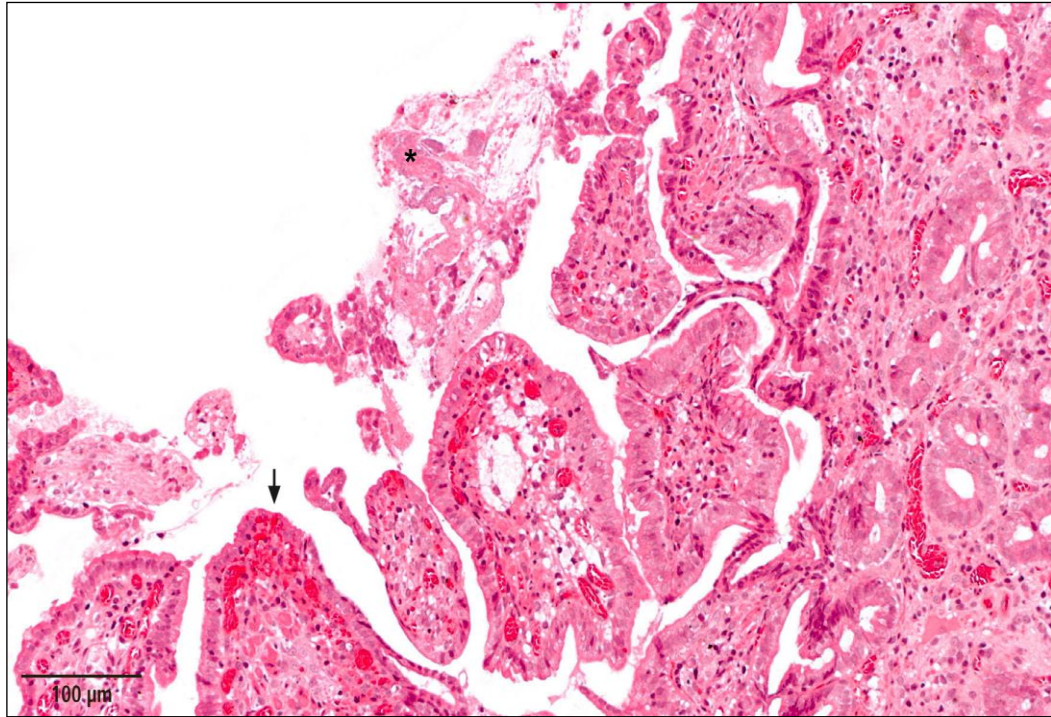


**Abbildung 12:** Duodenum von Patient Nr. 2 in einer HE-Färbung. In der Tiefe der *Lamina propria* ist ein akuter Untergang von Kryptepithel zu sehen (Pfeil), in diesem Bereich sind keine Bakterien nachweisbar.

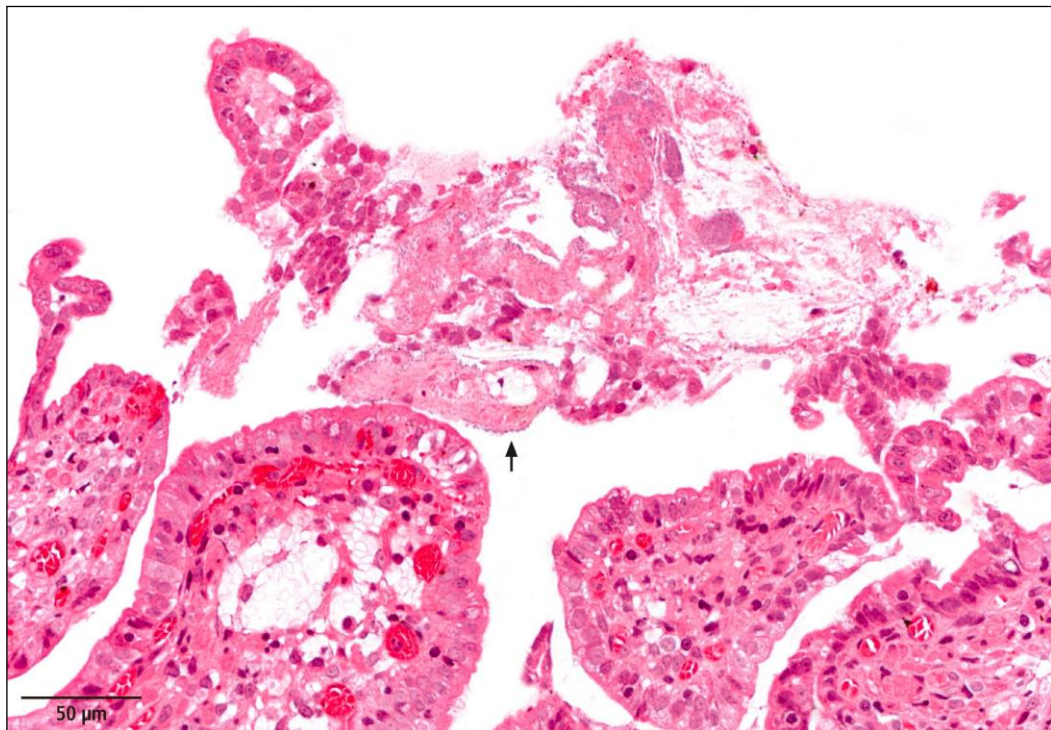
Der Ausprägungsgrad der nekrotischen und akut entzündlichen Veränderungen im Ileum reichte von gering- (3/8) über mittel- (3/8) bis hochgradig (2/8). In Tabelle 27 sind die histologischen Veränderungen des Ileums dargestellt. In den Abbildungen 13 und 14 werden charakteristische histologische Veränderungen der Ileumschleimhaut dargestellt.

**Tabelle 27: Histologische Beurteilung des Ileums** (L. p.: *Lamina propria*, Lymphoz.: Lymphozyten, Plasmaz.: Plasmazellen, Gr.: Granulozyten MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig, nb: nicht beurteilt, grau hinterlegt: Anzeichen chronischer Veränderungen - da diese Kriterien keine Relevanz für die akute Symptomatik haben, gingen sie nicht in die Gesamtbewertung des Einzeltieres mit ein)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Zottenverkürzung	1	2	0	nb	2	1	nb	2	2	3	1,6	0,9
Epithelzerstörung	0	1	0	nb	1	0	nb	2	2	3	1,1	0,8
Krypterweiterung	0	1	0	nb	1	0	nb	0	0	1	0,4	0,4
Lymphgefäßerweiterung	0	0	0	nb	1	1	nb	1	0	1	0,5	0,5
Schleimhautfibrose	0	0	0	nb	0	0	nb	0	0	0	0,0	0,0
Intraepitheliale Lymphoz.	0	0	0	nb	0	0	nb	0	0	0	0,0	0,0
L. p. Lymphoz. + Plasmaz.	0	0	1	nb	0	0	nb	0	0	1	0,3	0,4
L. p. eosinophile Gr.	0	0	0	nb	2	1	nb	0	0	0	0,4	0,7
L. p. neutrophile Gr.	0	1	2	nb	2	1	nb	3	2	1	1,5	0,9
<b>Summe</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>		<b>5</b>	<b>2</b>		<b>7</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>4,2</b>	



**Abbildung 13:** Ileum von Patient Nr. 8 in HE-Färbung. Hyperämie und geringgradige Ödematisierung der Zotten und kleinherdiger Untergang von Zottenepithel (Pfeil), nekrotischer Zottenabschnitt (\*).



**Abbildung 14:** Vorherige Abbildung von Patient Nr. 2 in Vergrößerung, im Bereich eines nekrotischen Zottenabschnittes hochgradige bakterielle Besiedlung (Pfeil).

#### 1.7.4. **Kolon**

Im Kolon wurden 57 Biopsien (im Durchschnitt 6,3/Tier) von neun Tieren entnommen. Insgesamt 55 der Biopsien (MW 6,1/Tier) waren für die histologische Untersuchung brauchbar.

Bei 9/9 Tieren wurden nekrotische Veränderungen nachgewiesen. Diese reichten von kleinherdigen Erosionen des Oberflächenepithels bis hin zu tiefreichender, bandartiger Nekrose unter Einbeziehung des Oberflächenepithels, des Kryptepithels und Anteilen der *Lamina propria*. Bei 6/9 Tiere waren die Nekrosen von mittlerem bis hohem Ausprägungsgrad. Ferner fanden sich eine deutliche Ödematisierung (4/9) und herdförmige Einblutungen in der *Lamina propria*. Erythrozyten und Fibrin waren bei 5/9 im Darmlumen zu sehen. Bei 5/9 Tieren waren die Krypten abschnittsweise dilatiert.

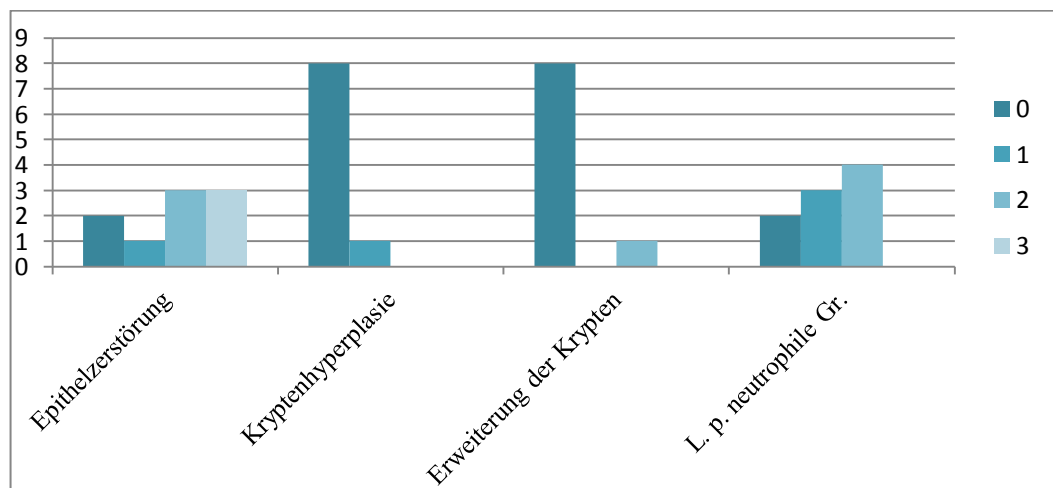
Eine neutrophil-granulozytäre Infiltration fand sich bei 9/9 Tieren und war vor allem um die nekrotischen Areale aber auch diffus in der *Lamina propria* lokalisiert. Eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten und Plasmazellen (2/9), eosinophilen Granulozyten (1/9) wurde in unterschiedlicher Ausprägung in der *Lamina propria* gesehen. Auch intraepithelial wurden häufiger konnte eine vermehrte Anzahl an Lymphozyten nachgewiesen werden. Die akut entzündlichen und nekrotischen Veränderungen im Kolon wurden bei 3/9 Tieren als geringgradig bei 2/9 Tieren als mittelgradig und bei 4/9 Tieren als hochgradig eingestuft.

In Tabelle 28 sind die histologischen Veränderungen des Kolons dargestellt. Die grau hinterlegten Felder kennzeichnen dabei Anzeichen von chronischen Veränderungen. Da diese keine Relevanz für die akute Symptomatik haben, gingen sie nicht in die Gesamtbewertung des Einzeltieres mit ein. Eine Zusammenfassung der histologischen Veränderungen des Kolons ist in Abbildung 15 dargestellt. In den Abbildungen 16 und 17 werden charakteristische histologische Veränderungen der Kolonschleimhaut dargestellt.



**Tabelle 28: Histologische Beurteilung des Kolons** (L. p.: *Lamina propria*, Lymphoz.: Lymphozyten, Plasmaz.: Plasmazellen, Gr.: Granulozyten, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, 0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig, nb: nicht beurteilt, grau hinterlegt: Anzeichen chronischer Veränderungen - da diese Kriterien keine Relevanz für die akute Symptomatik haben, gingen sie nicht in die Gesamtbewertung des Einzeltieres mit ein)

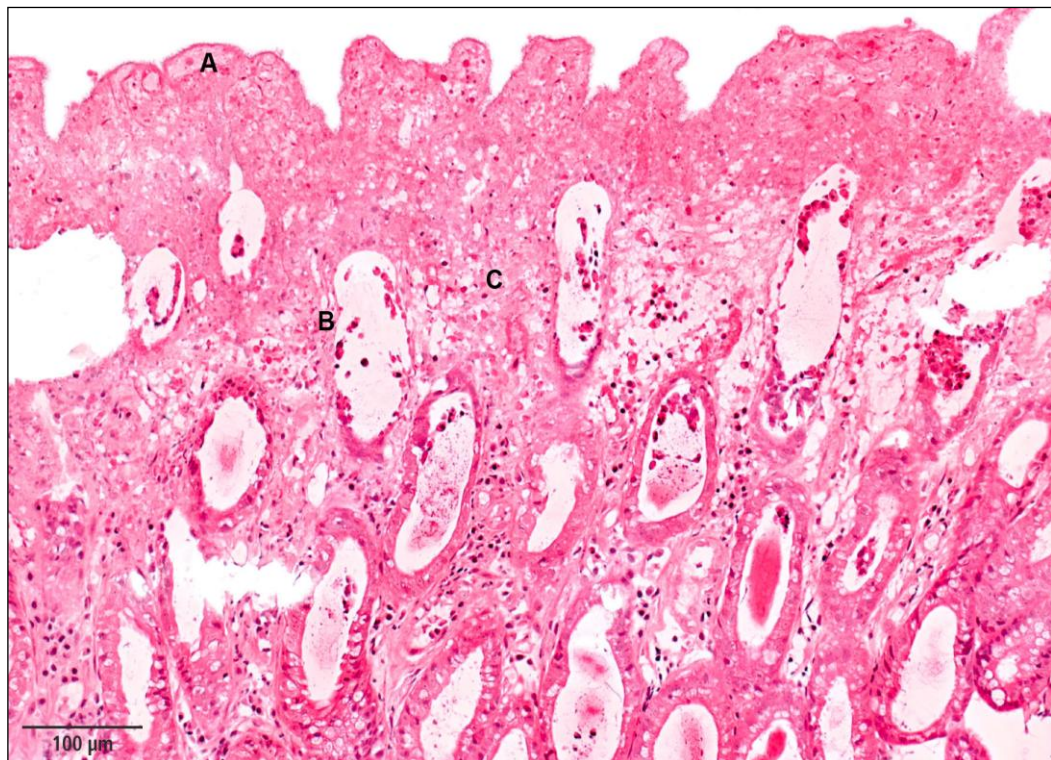
Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	SD
Zerstörung des Oberflächenepithels.	3	3	0	1	2	3	nb	3	2	1	2,0	1,1
Kryptenhyperplasie	0	0	0	0	1	0	nb	1	0	0	0,2	0,4
Erweiterung der Krypten	0	0	0	0	0	2	nb	0	0	0	0,2	0,7
Fibrose/Atrophie	0	0	0	0	0	0	nb	1	0	0	0,1	0,3
L. p. Lymphoz. + Plasmaz.	0	0	1	0	0	0	nb	1	0	0	0,2	0,4
L. p. eosinophile Gr.	0	0	0	1	0	0	nb	0	0	0	0,1	0,3
L. p. neutrophile Gr.	1	1	1	1	2	2	nb	2	2	2	1,6	0,5
L. p. Makrophagen	0	0	0	0	0	0	nb	0	0	0	0,0	0,0
Summe	4	4	1	2	4	5		5	4	3		



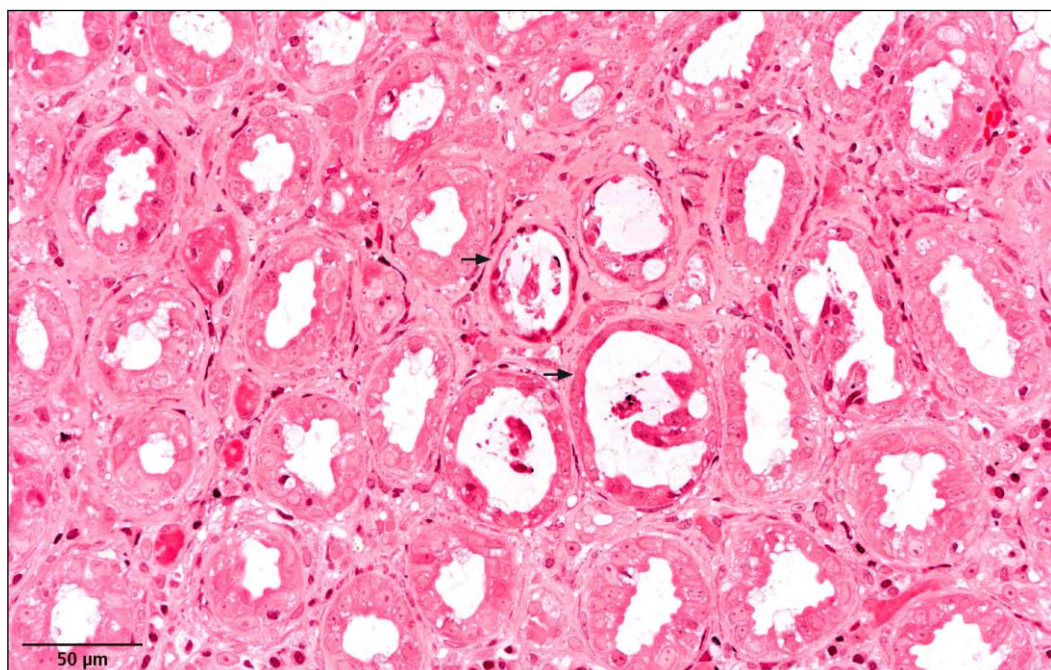
**Abbildung 15:** In dieser Abbildung sind die histologischen Veränderungen des Kolons für die Patientengruppe dargestellt. Auf der x-Achse sind die wichtigsten Veränderungen aufgeführt, auf der y-Achse ist die Anzahl der Patienten angegeben. Die verschiedenen Farben der Balken stellen den Schweregrad (0: physiologisch, 1: geringgradig, 2: mittelgradig, 3: hochgradig) der Veränderungen dar (L. p.: *Lamina propria*, Gr.: Granulozyten)

#### 1.8. Vergleich der Schwere der Veränderungen zwischen den einzelnen Lokalisationen

In der Endoskopie waren die makroskopischen Veränderungen im Duodenum signifikant stärker ausgeprägt als im Kolon. In der Histologie hingegen zeigten sich im Kolon deutlichere Läsionen.



**Abbildung 16:** Kolon von Patient Nr. 2 in HE-Färbung: tiefreichende bandartige Nekrose von Oberflächen- (A) und Kryptepithel (B) sowie der *Lamina propria* (C).



**Abbildung 17:** Kolon von Patient Nr. 6 in HE-Färbung: akuter Untergang von Kryptepithel; Krypten abschnittsweise dilatiert, mit Zelldedritus gefüllt und mit abgeflachtem Epithel ausgekleidet.



In Tabelle 29 ist eine Übersicht der endoskopischen und histologischen Veränderung von Duodenum und Kolon anhand der entsprechenden Scores für die gesamte Patientengruppe dargestellt.

**Tabelle 29: Endoskopie- und Histologiescores von Duodenum und Kolon (SD: Standardabweichung)**

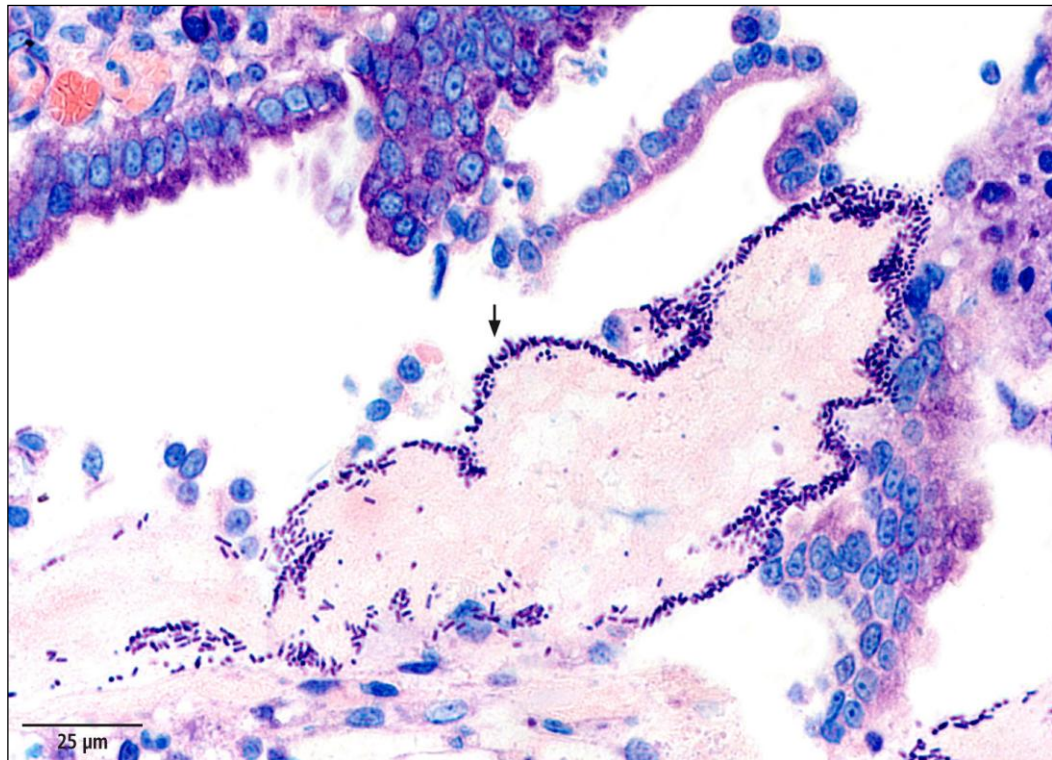
		<b>Median</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>SD</b>
Endoskopie	Duodenum	52,5	51,0	20,1
	Kolon	39	33,0	14,3
Histologie	Duodenum	7	7,4	5,4
	Kolon	12	10,7	4,0

#### 1.9. **Histologischer Nachweis von Bakterien**

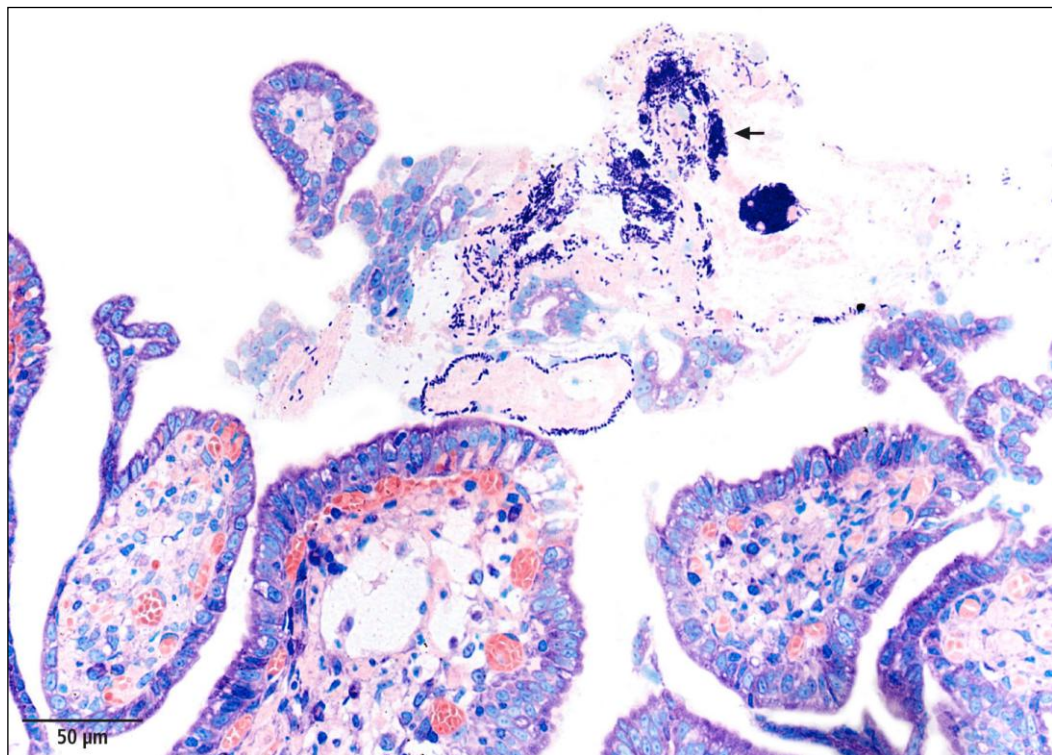
In der histologischen Untersuchung konnten bei 6/10 Tieren in der HE-Färbung violette und in der Giemsa-Färbung blaue, plumpe Stäbchen im Duodenum nachgewiesen werden. Diese saßen ausschließlich der nekrotischen Oberfläche in dichten Rasen an. In 3/9 Fällen wurde ein ähnliches Bild im Ileum beobachtet. Bei 2/10 Tieren waren die Bakterien lediglich im Schleim auf der Ileumoberfläche sichtbar und schienen nicht mit den Läsionen assoziiert zu sein. Im Kolon hafteten bei 6/9 Tieren plumpe, stäbchenförmige Bakterien auf der nekrotischen Schleimhautoberfläche. Bei den restlichen 3/9 Tieren wurden gleichartige Bakterien nur im Schleim innerhalb des Darmlumens nachgewiesen. In den Abbildungen 18, 19 und 20 sind die an der nekrotischen Oberfläche anhaftenden Bakterienrasen zu sehen. In Tabelle 30 ist eine Übersicht über die histologisch nachgewiesenen Bakterien auf der Darmschleimhaut dargestellt.

#### 1.10. **Immunhistologischer Nachweis von *Clostridium* spp.**

Aufgrund einer zu geringen Anzahl verwendbarer Paraffinschnitte konnte eine immunhistologische Untersuchung nur bei acht Tieren im Duodenum und bei 6/8 Tieren im Ileum durchgeführt werden. Dabei konnten bei 4/8 Tieren im Duodenum und bei 5/6 im Ileum *Clostridium* spp. nachgewiesen werden. So konnte bestätigt werden, dass es sich bei den histologisch festgestellten plumpen Stäbchen um Vertreter der Clostridienspezies handelt. Bei Tier Nr. 10 lagen keine untersuchbaren Schnitte vor. Die immunhistologischen Ergebnisse sind in Tabelle 31 aufgelistet. In Abbildung Nr. 21 ist das Kolon von Patient Nr. 2 dargestellt

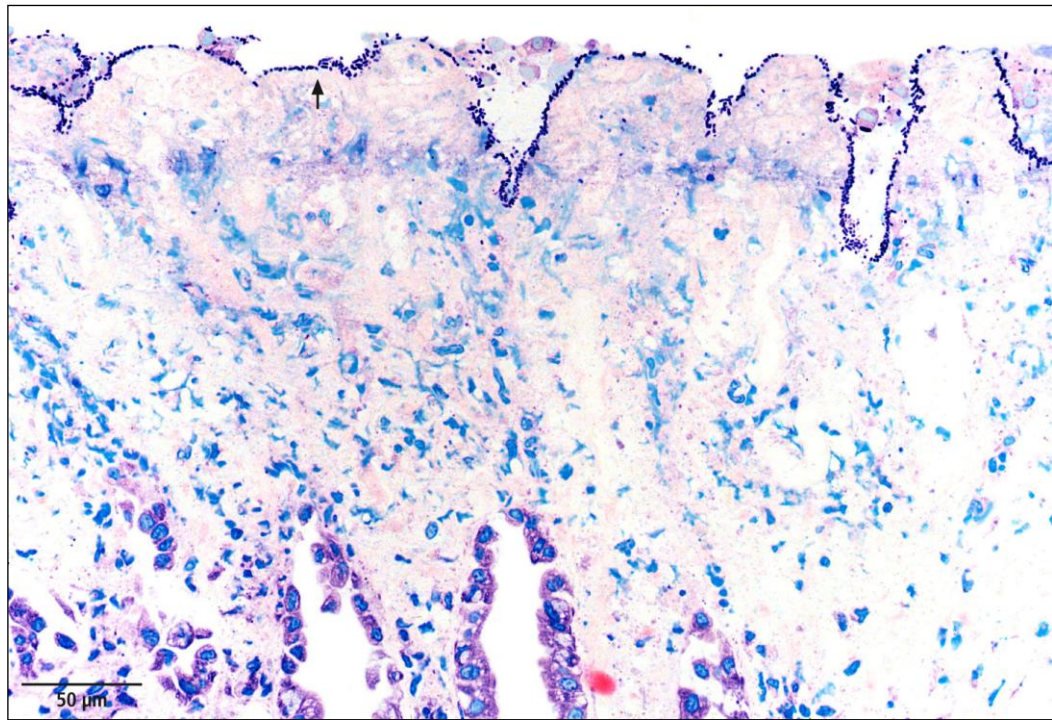


**Abbildung 18:** Duodenum von Patient Nr. 8 in einer Giemsa-Färbung: Zottennekrose, im Bereich der Nekrose hochgradig bakterielle Besiedlung mit plumpen Stäbchen (Pfeil).

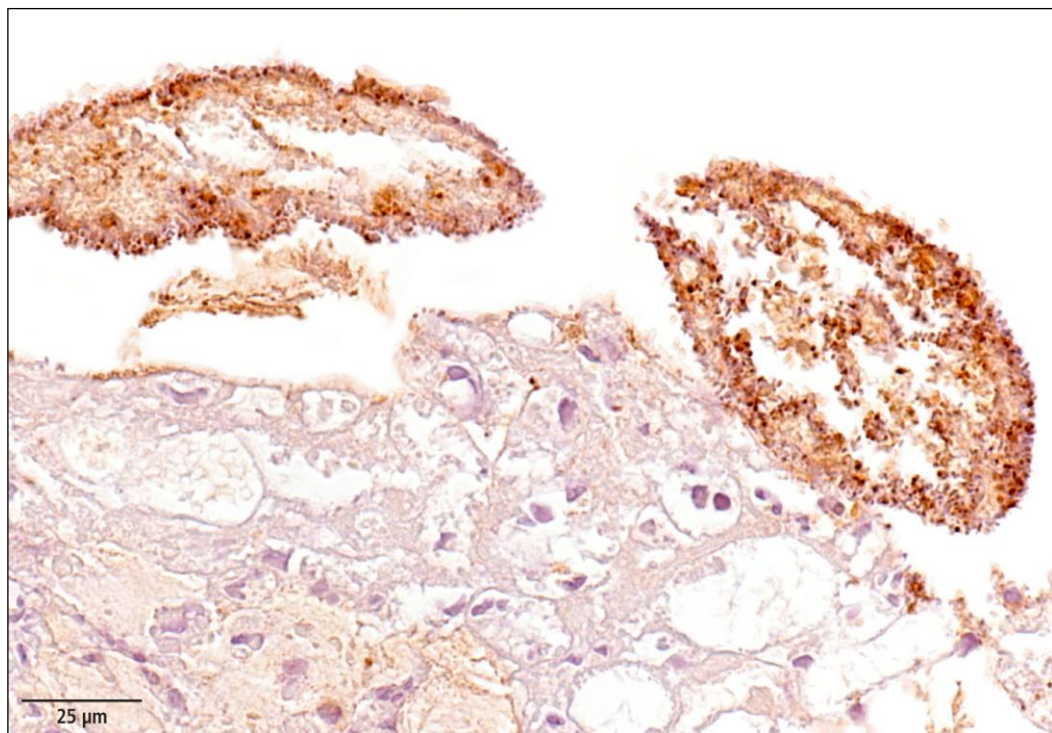


**Abbildung 19:** Ileum von Patient Nr. 8 in einer Giemsa-Färbung: im Bereich eines nekrotischen Zottenabschnittes hochgradig bakterielle Besiedlung.





**Abbildung 20:** Kolon von Patient Nr. 2 in Giemsa-Färbung: bandartige Nekrose mit oberflächlicher bakterieller Besiedlung mit plumpen Stäbchen (Pfeil).



**Abbildung 21:** Immunhistopathologischer Nachweis von Clostridien-Antigen im Bereich zweier untergegangener Anteile der Schleimhaut aus dem Kolon. Das Reaktionsprodukt liegt bevorzugt an der Oberfläche der Schleimhaut. Am unteren Bildrand findet sich Darmgewebe, welches besser erhalten ist, aber ebenfalls hochgradige Veränderungen gegenüber normaler Schleimhaut aufweist.

### 1.10.1. Übersicht Bakteriennachweis

Bei 8/9 Tieren konnten in mindestens einer Lokalisation *Clostridium* spp. identifiziert werden, lediglich bei Tier Nr. 3 war kein Nachweis möglich. In 7/9 Fällen saßen die Bakterien sowohl im Duodenum als auch im Ileum in dichten Rasen auf der nekrotischen Oberfläche. Bei zwei Tieren konnten die Clostridien nur im Schleim auf der Oberfläche der Ileumschleimhaut gefunden werden. In Tabelle 31 ist die Häufigkeit und die Lokalisation der immunhistologisch nachgewiesenen *Clostridium* spp. dargestellt. Bei drei Tieren waren sowohl der bakteriologische, der histologische als auch der immunhistologische Nachweis von *Clostridium* spp. positiv. Bei vier Tieren konnte in unterschiedlicher Kombination zwei Untersuchungen und bei drei Tieren lediglich eine Untersuchung für positiv auf Vorliegen von *Clostridium* spp. befunden werden. Somit konnte bei jedem Tier der Patientengruppe im Bereich des Dünndarmes *Clostridium* spp. nachgewiesen werden. Bis auf Tier Nr. 6 konnte bei allen Tieren die Zugehörigkeit der histologisch beobachteten plumpen Stäbchen zur Gattung der Clostridien bestätigt werden. In Tabelle 32 ist der Nachweis von *Clostridium* spp. mittels der unterschiedlichen Methoden als Übersicht dargestellt.

**Tabelle 30: Übersicht über den Nachweis von *Clostridium* spp. im Dünndarm**  
(nd: nicht durchgeführt)

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
bakteriologisch	nd	+	+	+	+	-	-	+	-	+
histologisch	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
immunhistologisch	+	+	-	+	-	-	+	+	+	nd

**Tabelle 31: Histologischer Nachweis von Bakterien** (pos: positiv, neg: negativ, nekrot. Obfl.: nekrotische Oberfläche, Schl. a. Obfl.: Schleim auf Oberfläche, nd: nicht durchgeführt)

Patient	Duodenum	Lokalisation	Menge	Ileum	Lokalisation	Menge	Kolon	Lokalisation	Menge
1	pos	nekrot. Obfl.	+++	neg		-	pos	nekrot. Obfl.	++
2	pos	nekrot. Obfl.	++	pos	nekrot. Obfl.	++	pos	nekrot. Obfl.	++
3	neg		-	neg		-	pos	nekrot. Obfl.	+
4	pos	nekrot. Obfl.	+	neg		-	pos	Schl a. Obfl.	++
5	neg		-	pos	Schl. a. Obfl.	++	pos	nekrot. Obfl.	+++
6	neg		-	pos	Schl. a. Obfl.	++	pos	Schl.a. Obfl.	+
7	pos	nekrot. Obfl.	++	nd			nd		
8	pos	nekrot. Obfl.	+++	pos	nekrot. Obfl.	+++	pos	nekrot. Obfl.	+
9	neg		-	pos	nekrot. Obfl.	++	pos	nekrot. Obfl.	++
10	pos	nekrot. Obfl.	+	neg		-	pos	nekrot. Obfl.	+

**Tabelle 32: Immunhistologischer Nachweis von *Clostridium* spp.** (pos: positiv, neg: negativ, nd: nicht durchgeführt)

Patient	Duodenum	Lokalisation	Ileum	Lokalisation
1	pos	nekrotische Oberfläche	nd	
2	nd		pos	nekrotische Oberfläche
3	neg		neg	
4	pos	nekrotische Oberfläche	nd	
5	neg		pos	Schleim auf Oberfläche
6	neg		pos	Schleim auf Oberfläche
7	pos	nekrotische Oberfläche	nd	
8	pos	nekrotische Oberfläche	pos	nekrotische Oberfläche
9	neg		pos	nekrotische Oberfläche
10	nd		nd	

## 2. Toxinstudie

Die Ergebnisse der Nachweise von Toxinen und Toxingenen von *C. perfringens* und *C. difficile* im Kot von Hunden mit und ohne AHDS wurden ausgewertet. Desweiteren wurden Vergleiche innerhalb der Gruppe zwischen Tieren mit positiven und Tieren mit negativen Testergebnissen durchgeführt.

### 2.1. Signalement und Anamnese

Bei der Patientengruppe handelte es sich um 54 Tiere. 26 Tiere waren weiblich, davon elf kastriert und 26 männlich, davon sechs kastrierte Tiere. Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 23 Tieren mit 14 weiblichen, zehn davon kastriert und neun männlichen, vier davon kastriert. Am häufigsten vertreten waren in der Patientengruppe Mischlinge unter 10 kg (12/54), gefolgt von Mischlingen über 10 kg (7/54) und Yorkshire Terriern (3/54). Die Kontrollgruppe setzte sich vornehmlich aus Mischlingen über 10 kg (9/54) gefolgt von Labrador Retrievern (3/54) und Rottweilern (2/54) zusammen. Der Altersmedian der Tiere der Patientengruppe lag bei 4 Jahren. Der Median für das Gewicht betrug 9,7 kg schwer. Der Median des Alters der Kontrolltiere betrug drei Jahre, der Median für das Gewicht 23,8 kg.

Bei 11 % (6/54) der Tiere wurde vom Besitzer angegeben, dass das Futter gewechselt wurde oder etwas Ungewohntes gefüttert wurde. Bei 6 % (2/54) der Hunde wurde vorberichtlich beobachtet, dass die Hunde Schnee gefressen hatten. Antibiotisch vorbehandelt wurden 9 % (5/54) der Patienten, wobei jeweils ein Hund Penicillin, Sulfonamid-Trimethoprim oder Cephalosporin der ersten Generation erhalten hatte. Bei zwei Hunden konnte die Art des Antibiotikums in der Anamnese nicht eruiert werden.

### 2.2. Laborparameter

Hinsichtlich verschiedener Laborparameter waren zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe Unterschiede zu verzeichnen. Der Median des Hämatokrits lag bei Patientengruppe bei 57 %. Bei 21/54 Patienten lag der Hämatokrit oberhalb des Referenzbereiches (35 – 58 %). In der Kontrollgruppe hingegen lagen alle Hämatokritwerte (23/23) innerhalb des Referenzbereiches. Bei Betrachtung der Gesamtleukozytenanzahl hatten 18/54 Patienten Werte oberhalb des Referenzbereiches. Diese Gesamtleukozytenerhöhung spiegelte

hauptsächlich eine erhöhte Anzahl der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten wider, die bei 32/54 Patienten erhöht waren. Der Median der Gesamtleukozytenzahl lag in der Patientengruppe bei  $9,01 \times 10^9/l$  und befand sich oberhalb des Referenzbereiches ( $3 - 9 \times 10^9/l$ ). Auch die Anzahl der stabkernigen neutrophilen Granulozyten lag bei 26/54 Patienten über dem Referenzbereich, während alle Werte bei den Kontrolltieren unauffällig waren. Die Serumwerte unterschieden sich bis auf eine Ausnahme nicht signifikant voneinander, lediglich die Aktivität der ALT war in der Patientengruppe signifikant höher als bei den gesunden Tieren. Der Median von ALT (54 U/l) befand sich innerhalb des Referenzbereiches (18 – 110 U/l), da lediglich 14/54 erkrankten Tiere erhöhte Werte aufwiesen. In Tabelle 33 sind Laborwerte vergleichend zwischen Patienten- und Kontrollgruppe dargestellt.

**Tabelle 33: Laborwerte im Vergleich zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe** (ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: alkalische Phosphatase, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung)

	Patientengruppe			Kontrollgruppe			p-Wert
	Median	MW	SD	Median	MW	SD	
Hämatokrit (%)	57	55,9	9,8	45	45,9	4,8	< 0,001
Leukozyten ( $\times 10^9/l$ )	10,9	12,15	0,44	8,4	8,49	1,670	< 0,001
Stabkernige neutrophile Gr. ( $\times 10^9/l$ )	0,48	0,650	0,709	0,07	0,0973	0,103	< 0,001
Segmentkernige neutrophile Gr. ( $\times 10^9/l$ )	9,01	9,519	4,018	4,90	5,397	1,568	< 0,001
Thrombozyten ( $\times 10^9/l$ )	351	356,0	124,7	286	293,6	90,2	0,036
ALT (U/l)	54	88,9	173,4	33	38,0	19,9	0,003
AP (U/l)	43	63,5	50,8	31	42,7	37,7	0,080
Bilirubin (mmol/l)	2,4	2,63	1,23	2,4	2,40	1,04	0,679
Gesamteiweiß (g/l)	60	59,3	10,2	61	61,4	3,6	0,345
Albumin (g/l)	35	33,9	6,3	37	37,0	3,1	0,029
Glukose (mmol/l)	5,4	5,41	1,83	5,14	5,29	0,50	0,679

### 2.3. Kotuntersuchungen

Die Kotproben wurden mittels Antigen-ELISA auf Toxine und mittels PCR auf Toxin tragende Gene von *Clostridium* spp. untersucht. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit eines positiven Nachweises von CPE zwischen der erkrankten Gruppe und den gesunden Kontrolltieren gesehen. Zwar konnte nur bei 13/54 der erkrankten Tiere wirklich CPE im Kot gefunden werden, jedoch war der Nachweis bei keinem der gesunden Tiere möglich. Ebenfalls

signifikant war der Unterschied einer positiven PCR auf die für CPE codierenden Region zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe. Dieser Test war bei 35/54 Patienten positiv, jedoch auch bei 9/23 gesunden Hunden. Die Kombination beider Tests brachte keine Erhöhung der Signifikanz hinsichtlich der unterschiedlichen Nachweishäufigkeit von Toxin-produzierenden *C. perfringens* zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

In Bezug auf den Nachweis von *C.-difficile*-Toxinen konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Bei 2/54 Patienten und bei keinem der Kontrolltiere war der kombinierte ELISA für Toxin A und B positiv. Das Gen codierend für Toxin B von *C. difficile* konnten bei 10/54 Patienten und 2/23 Kontrolltieren nachgewiesen werden, somit lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor. Bei keinem der Tiere (0/5) die vorberichtlich Antibiotika erhalten hatten, konnte Toxin A und B und für Toxin B codierendes Gen gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

#### 2.4. Vergleich positiv und negativ getesteter Tiere

Innerhalb der Patientengruppe wurden Laborparameter und der AHDS-Index zwischen den mittels ELISA positiv und den negativ getesteten Patienten auf CPE verglichen. Neben CPE wurde auch ein Vergleich von Patienten mit positivem und negativem Nachweis des cpe durchgeführt.

##### 2.4.1. Toxinnachweis

Innerhalb der erkrankten Patientengruppe wurden die Tiere in zwei Untergruppen anhand des Nachweises von CPE mittels ELISA unterteilt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den positiv und den negativ getesteten Tieren in Bezug auf Laborparameter, Dauer des Aufenthaltes oder Krankheitsschweregrad gesehen werden. In Tabelle 35 werden die Laborparameter zwischen der ELISA positiven und der negativen Gruppe verglichen.

##### 2.4.2. Gennachweis

Wurden die Gruppen nach positivem und negativem PCR Ergebnis für cpe unterteilt, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In Tabelle 36 werden die Laborparameter zwischen der PCR-positiven und der -negativen Gruppe verglichen.



**Tabelle 34: Nachweis von Toxinen und für Toxin codierende Gene von *Clostridium perfringens* und *Clostridium difficile*** (CPE: *C.-perfringens*-Enterotoxin, cpe: Gen für CPE, ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, PCR: Polymerase Chain Reaction, tcdB: für Toxin B codierendes Gen; signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit rot gekennzeichnet)

	Testmethode	Anzahl Patienten	Anteil (%)	Anzahl Kontrolltiere	Anteil (%)	p-Wert
<i>Clostridium perfringens</i>	CPE-ELISA	13/54	24,1	0/23	0,0	0,008
	cpe-PCR	35/54	64,8	9/23	39,1	0,047
	ELISA + PCR	13/54	24,1	0/23	0,0	0,008
<i>Clostridium difficile</i>	A/B-ELISA	2/54	3,7	0/23	0,0	1,000
	tcdB-PCR	10/54	18,5	3/23	13,0	0,744
	ELISA + PCR	1/54	1,9	0/23	0,0	1,000

**Tabelle 35: Vergleich von Laborwerten und AHDS-Index zwischen CPE-ELISA positiven und negativen Tieren innerhalb der Patientengruppe** (ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, AHDS: akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom, ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: alkalische Phosphatase, SD: Standardabweichung)

	CPE-ELISA positive Tiere (13)			CPE-ELISA negative Tiere (41)			p-Wert
	Median	Mittelwert	SD	Median	Mittelwert	SD	
AHDS-Index	10	10,2	3,0	12	12,1	2,2	0,029
Dauer des Aufenthaltes	3	4,0	2,3	3	3,6	1,7	0,815
Hämatokrit (%)	55,0	52,23	10,22	57,5	57,00	9,47	0,158
Leukozyten ( $10^9/l$ )	14,3	14,32	5,06	10,5	11,48	4,09	0,063
Stabkernige neutrophile Granulozyten ( $\times 10^9/l$ )	0,51	0,703	0,788	0,45	0,639	0,700	0,787
Segmentkernige neutrophile Granulozyten ( $\times 10^9/l$ )	23,65	11,620	4,552	8,39	8,962	3,741	0,077
Thrombozyten ( $\times 10^9/l$ )	290	293,6	82,4	372	375,0	130,0	0,057
ALT (U/l)	61	73,3	59,1	52	93,6	196,1	0,802
AP (U/l)	38	48,5	44,7	44	68,1	52,2	0,258
Bilirubin (mol/l)	2,4	3,86	3,90	2,4	2,68	1,30	0,729
Gesamteiweiß (g/l)	63,7	63,32	10,30	59,9	58,05	9,92	0,135
Albumin (g/l)	37,5	36,97	4,82	33,7	32,92	6,61	0,063
Glukose (mmol/l)	5,1	5,07	1,74	5,4	5,52	1,87	0,634

**Tabelle 36: Vergleich von Laborwerten und AHDS-Index zwischen cpe-PCR positiven und negativen Tieren innerhalb der Patientengruppe**  
(PCR: Polymerase Chain Reaction, AHDS: akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom, ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: alkalische Phosphatase, SD: Standardabweichung)

	cpe-PCR positive Tiere (35)			cpe-PCR negative Tiere (19)			p-Wert
	Median	Mittelwert	SD	Median	Mittelwert	SD	
AHDS-Index	12	11,6	2,8	12	12,2	1,3	0,392
Dauer des Aufenthaltes	3	3,8	1,7	3	3,8	1,7	0,520
Hämatokrit (%)	56,2	55,74	10,74	56,5	55,79	9,82	0,988
Leukozyten ( $\times 10^9/l$ )	10,7	11,84	4,72	13,2	12,64	4,04	0,555
Stabkernige neutrophile Granulozyten ( $\times 10^9/l$ )	0,46	0,667	0,769	0,72	0,745	0,781	0,550
Segmentkernige neutrophile Granulozyten ( $\times 10^9/l$ )	9,70	9,939	3,997	9,04	9,518	3,815	0,752
Thrombozyten ( $\times 10^9/l$ )	309	336,3	106,2	363	379,3	158,5	0,320
ALT (U/l)	63	76,5	52,4	47	57,1	36,0	0,193
AP (U/l)	45	62,1	52,8	36	56,0	46,6	0,592
Bilirubin (mol/l)	2,3	2,51	1,14	2,3	2,35	1,00	0,641
Gesamteiweiß (g/l)	62,0	59,73	11,84	60,4	59,46	9,87	0,939
Albumin (g/l)	35,5	34,75	6,46	34,1	33,15	6,63	0,452
Glukose (mmol/l)	5,6	5,33	1,59	5,4	5,45	2,35	0,704

## V. DISKUSSION

Akut auftretender blutiger Durchfall ist ein Symptom, welches zwar schon lange bekannt ist, bei dem allerdings nach wie vor kein Auslöser identifiziert werden konnte. Neben dem Begriff „akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom“, hatte sich vor allem der Name „Hämorrhagische Gastroenteritis“ etabliert. Grund hierfür war unter anderem, dass wegen des blutigen Erbrechens eine entzündliche Komponente des Magens angenommen wurde. Bei den histologischen Untersuchungen von PRESCOTT und Mitarbeitern (1978) zweier am AHDS verstorbener Hunde, konnte bei einem Tier eine oberflächliche Nekrose im Magen festgestellt werden, der Fibrin, Debris und Bakterien anhafteten (PRESCOTT et al., 1978). Ebenfalls waren wenige Entzündungszellen sichtbar. HILL (1972) hingegen konnte bei seinen pathologischen Untersuchungen, die er an einer unbekannten Anzahl verstorbener Tiere mit AHDS durchgeführt hatte, keine Veränderungen im Magen feststellen (HILL, 1972). Auch SASAKI (1999) beschreibt keine Veränderungen am Magen (HILL, 1972; PRESCOTT et al., 1978; SASAKI et al., 1999). Auch wenn die histologischen Befunde aus den vorangegangenen Studien in Bezug auf den Magen differieren, so ist ihnen doch allen eines gemeinsam: Die Untersuchungen wurden an verstorbenen Tieren, ohne Angabe der Zeitabstände zwischen Tod und Obduktion, durchgeführt - ein Umstand, der die Aussagekraft der Befunde stark einschränkt. *Post mortem* kommt es durch fehlende Abwehrmechanismen, wie erloschene Peristaltik und offenstehende Sphinkteren, zu einer starken bakteriellen Überwucherung des gesamten Darmtraktes. Dies führt dazu, dass autolytische Prozesse besonders im Darm rasch einsetzen. Aus diesem Grund ist es bei *post mortem* entnommenen Gewebeproben des Magendarmtraktes schwierig, bei dem sich präsentierenden Bild zwischen den pathologischen Veränderungen zu Lebzeiten und der *post mortem* entstandenen Zerfallsprozessen zu unterscheiden.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals prospektiv die endoskopischen und histologischen Veränderungen im Magendarmtrakt bei lebenden Hunden mit AHDS untersucht. Dadurch können die tatsächlichen Veränderungen von *post-mortem*-bedingten Artefakten abgegrenzt und damit ein unverfälschtes Bild gewonnen werden.

Bei allen zehn Patienten dieser Studie konnten weder makroskopisch, noch histologisch Anzeichen einer akuten Entzündung im Magen festgestellt werden. Alle histologischen Veränderungen, auch bei jenen Hunden, die blutiges Erbrechen gezeigt hatten, waren chronischer Natur (lymphoplasmazelluläre Infiltration und Fibrose) und standen somit nicht im Zusammenhang mit dem akuten Krankheitsgeschehen.

Dennoch muss bedacht werden, dass, auch wenn es sich in diesem Falle nur um ein Tier gehandelt hat, PRESCOTT und Mitarbeiter (1978) durchaus relevante Veränderungen im Magen eines an AHDS verstorbenen Patienten nachweisen konnten (PRESCOTT et al., 1978). Diese Läsionen in Form von eingewanderten Entzündungszellen und Fibrinausschwitzungen müssen als Hinweise eines Entzündungsgeschehens *intra vitam* gewertet werden. Da alle in der vorliegenden Studie endoskopierte Tiere die Erkrankung überlebten, bleibt die Überlegung, ob in einem besonders schweren Verlauf der Erkrankung eine Einwanderung von Bakterien in den Magen und eine akute Entzündung dort ebenfalls stattfinden kann. Dennoch scheint die Beteiligung des Magens auch bei blutigem Erbrechen eher selten zu sein.

In Ermangelung eines Beweises bezüglich der Beteiligung des Magens am Krankheitsgeschehen, ist der Begriff „hämorrhagische Gastroenteritis“ folglich als nicht adäquat zu bezeichnen, da dieser eine Entzündung des Magens impliziert. Vielmehr sollte, so lange ein Beweis für das auslösende Agens dieser Erkrankung noch aussteht, der Name „akutes hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom“ verwendet werden. Diese Bezeichnung beinhaltet eine korrekte Beschreibung der Symptomatik ohne falsche Aussagen über die Entstehung der Krankheit zu machen.

Da es viele bekannte Ursachen für akuten blutigen Durchfall gibt (z. B. Parvovirose oder Hypoadrenokortizismus), sollte der Begriff AHDS nur einer sehr definierten Patientengruppe vorbehalten sein. Die Bezeichnung sollte nur für Patienten verwendet werden, bei denen keine bekannte Ursache für den akuten blutigen Durchfall gefunden wurde. Da es sich somit um eine Ausschlussdiagnose handelt, ist die Durchführung folgender Untersuchungen bei jedem Patienten notwendig. Eine spezifische Anamnese sollte zum Ausschluss einer Magendarmschleimhautschädigung durch Medikamente, wie z. B. nichtsteroidale Antiphlogistika oder Glukokortikoide erhoben werden. Eine Hämatologie eignet

sich zum Ausschluß einer Magendarmblutung durch Thrombozytopenie und kann Hinweise auf eine Parvovirose (Neutropenie) oder eine systemische Infektion mit enteropathogenen Keimen (Neutrophilie mit signifikanter Linksverschiebung) geben. Eine Blutchemie inklusive Elektrolytmessungen hilft beim Ausschluss eines Leber- und Nierenversagens und eines Hypoadrenokortizismus. Eine Kotuntersuchung dient vor allem zum Ausschluss von Parasiten (z. B. *Trichuris vulpis*, Giardien) und Viren (z. B. Parvoviren). Bildgebende Verfahren sind notwendig, um Obstruktionen (z. B. Fremdkörper, Invagination), sowie entzündliche (z. B. Pankreatitis, Peritonitis) und neoplastische Prozesse im Abdomen (z. B. Verlust der Darmschichtung, signifikante Lymphknotenvergrößerung) auszuschliessen.

Patienten mit positiven Kotkulturen auf sogenannte enteropathogene Keime sollten derzeit nicht von der Diagnose AHDS ausgeschlossen werden. Die Rolle dieser Bakterien, als Auslöser für gastrointestinale Symptome, ist derzeit noch nicht genau geklärt. Viele, als „potentiell enteropathogen“ bezeichnete Keime, z. B. *E. coli* und *Clostridium* spp., gehören zur physiologischen Dickdarmflora beim Hund. Sogar *Salmonella* spp. können häufig bei gesunden Tieren, insbesondere bei Hunden mit Frischfleischfütterung, gefunden werden (MCKENZIE et al., 2010).

Hinsichtlich der endoskopischen Untersuchung des Darmes stellte sich ein äußerst inhomogenes Bild dar. Während sich bei einigen Tieren die stärksten Veränderungen im Duodenum zeigten (Nr. 2, 3, 6 und 8), wiesen andere deutlichere Läsionen im Kolon (Nr. 4 und 10) auf. Obwohl der Schweregrad der Läsionen in den verschiedenen Lokalisationen sehr heterogen war, konnte doch gezeigt werden, dass in der Regel sowohl im Dünn- als auch im Dickdarm makroskopische Veränderungen in Form von Hyperämien, Blutungen und Erosionen vorhanden sind.

Die beobachteten makroskopischen Veränderungen korrelierten jedoch nicht mit dem histologischen oder klinischen Schweregrad der Erkrankung. Dieses Phänomen konnte bereits bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen beobachtet werden. Die in den entsprechenden Studien untersuchten Hunde zeigten keine Verbesserung der histologischen Veränderungen trotz erfolgreicher Therapie (ALLENSPACH et al., 2006; GARCÌA-SANCHO et al., 2007; SCHREINER et al., 2008). Somit ist es nicht möglich, anhand der klinischen

Symptome auf den Schweregrad der Darmwandschädigung zu schließen.

Histologische Veränderungen der Dün- und Dickdarmschleimhaut bei Hunden mit akutem blutigem Durchfall wurden bereits in vorangegangenen Veröffentlichungen (HILL, 1972; PRESCOTT et al., 1978; SASAKI et al., 1999) beschrieben. Während HILL (1972) oberflächlichen Veränderungen der Schleimhaut (zerrissene Villi) beschrieb, stellten SASAKI und Mitarbeiter (1999) eine tiefgreifende Zerstörung der Mukosa fest. Wie bereits erwähnt ist die Wertung dieser Befunde äußerst schwierig, da es sich in der Regel um Sektionen von verstorbenen Tieren handelt. In der vorliegenden Studie wurden ebenfalls Epithelzerstörung und Zottenatrophie beobachtet, mit dem Unterschied, dass man aufgrund der *intra vitam* entnommenen Biopsien davon ausgehen kann, dass es sich um tatsächliche Veränderungen handelt.

Auch in dieser Studie war das Ausmaß der Entzündung individuell sehr unterschiedlich. Während ein Tier eine hochgradige Infiltration mit neutrophilen Granulozyten aufwies, war bei drei Tieren keine vermehrte Anzahl an Entzündungszellen zu erkennen. Zum einen hängt dies wohl mit der Schwere der Erkrankung zusammen, die bei allen Tieren unterschiedlich ausgeprägt war. Zum anderen muss bedacht werden, dass die Entzündungsreaktion häufig der akuten Symptomatik hinterherhinkt und somit einige Tiere zu einem Zeitpunkt endoskopiert wurden, bevor eine deutliche Entzündung überhaupt erst auftreten konnte.

Histologisch waren sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm Läsionen zu finden, wobei die Zerstörung des Oberflächenepithels in jeder Region als wichtigste Läsion im Vordergrund stand. Im Dickdarm waren die Veränderungen meist deutlicher ausgeprägt.

Es handelt sich somit beim AHDS des Hundes um eine diffuse Darmerkrankung mit vorwiegend Läsionen des Oberflächenepithels. Nekrose ohne Infiltration von Entzündungszellen könnte am ehesten durch eine Sauerstoffunterversorgung, durch eine perakute virale Infektion oder durch eine toxische Schädigung der Mukosa erklärt werden. Da die Patienten keine massive Schocksymptomatik aufwiesen und Parvovirose sowohl durch ELISA als auch immunhistologisch ausgeschlossen wurde, erscheint eine schädigende Einwirkung von z. B. Bakterientoxinen auf die Darmschleimhaut am wahrscheinlichsten. Erhärtet wird

dieser Verdacht durch den Nachweis von *C. perfringens* bei allen Tieren der vorliegenden Studie.

Wie auch schon SASAKI und Mitarbeiter (1999) und PRESCOTT und Mitarbeiter (1978) bei insgesamt drei Tieren gezeigt haben (PRESCOTT et al., 1978; SASAKI et al., 1999), konnten in dieser Studie bei 6/10 Patienten plumpe Stäbchen histologisch beobachtet werden, welche der nekrotischen Schleimhautoberfläche eng anhafteten. Mittels Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um *Clostridium* spp. handelt. Die vorgefundenen Clostridien konnten aus endoskopisch steril entnommenen Dünndarmbiopsien angezüchtet und mittels MALDI-TOF als *C. perfringens* identifiziert werden.

Die erste Überlegung, die man im Zusammenhang mit dem Nachweis von Clostridien bei den Studienpatienten machen sollte, ist, ob sich Clostridien physiologisch im proximalen Dünndarm aufhalten und welche anderen nachgewiesenen Keime potentiell zum Krankheitsgeschehen beigetragen haben könnten. Leider wurden bisher nur zwei Studien veröffentlicht, die sich mit der physiologischen Darmflora bei Hunden befassen. Bei DAVIS und Mitarbeitern (1977) konnten in der Kultur *C. perfringens* nur aus dem Zäkum angezüchtet werden. Im Dünndarm konnten insgesamt nur wenige Bakterien gefunden werden, welche sich hauptsächlich im Lumen befanden und nur vereinzelt auf der Epitheloberfläche zu finden waren (DAVIS et al., 1977). In einer Studie von BENNO und Mitarbeitern (1992) konnten immerhin bei einem von acht jungen und bei vieren von acht alten Beageln Clostridien im Duodenum in geringer Anzahl kulturell nachgewiesen werden konnte (BENNO et al., 1992). Da folglich Clostridien meist nur in kleiner Anzahl den Dünndarm bewohnen, ist es verständlich, dass nur bei einem der Kontrolltiere *C. perfringens* in der Kultur angezüchtet werden konnte. Neben den Clostridien wurden bei BENNO und Mitarbeitern (1992) auch zahlreiche andere Bakterien als Teil der physiologischen Darmflora aufgeführt, die mit Ausnahme von *Morganella* spp. und *Stenotrophomonas* spp. auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden konnten. Natürlich darf nicht vergessen werden, dass auch *E. coli* theoretisch durch die Produktion zahlreicher unterschiedlicher Toxine, wie beispielsweise dem Shiga- oder Verotoxin, dazu in der Lage wäre, die Darmwand in einem histologisch sichtbaren Maße zu schädigen (BENNO et al., 1992). Jedoch muss dabei bedacht werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen dem



Vorkommen von *E. coli* bei den erkrankten (5/10) und den gesunden Hunden (6/11) zu erkennen war, während *C. perfringens* signifikant häufiger bei den erkrankten Hunden nachzuweisen war.

Natürlich bleibt die Überlegung, ob die Clostridien lediglich die Vorteile einer anderen bestehenden Darmerkrankung, wie eine verminderte Peristaltik und ein bereits vorgeschädigten Epithels nutzen können, um vermehrt in den Dünndarm aufzusteigen und sich in den nekrotischen Regionen anzuheften oder wirklich primär Verursacher dieser Läsionen waren. Für die Rolle als Sekundärbesiedler spricht, dass bereits TURK und Mitarbeiter (1992) publizierten, dass bei 98 % der obduzierten an Parvovirose verstorbenen Welpen bakteriologisch Clostridien zu finden waren (TURK et al., 1992). Allerdings ist bei dieser Studie zu bedenken, dass die Proben *post mortem* im Rahmen der pathologischen Untersuchung, ohne Angabe der Zeitabstände, entnommen wurden und somit möglicherweise ein verfälschtes Bild entstanden ist. Die histologischen Veränderungen bei einer Parvovirose ähneln jedoch histologisch denen einer akuten hämorrhagischen Diarrhoe. MEUNIER und Mitarbeiter (1985) beschreiben eine ausgedehnte Nekrose der epithelialen Zellen der Krypten und einen Zerfall der *Lamina propria* bei Hunden mit Parvovirose genauso, wie meist nur milde Anzeichen einer Entzündung. Trotz dieses Epithelverlustes wird bei keinem der Tiere ein dichter Rasen von an der Oberfläche anhaftenden Bakterien, wie es bei einigen unserer Studienpatienten beobachtet wurde, erwähnt (MEUNIER et al., 1985). Folglich sind hochgradige Läsionen der Schleimhaut alleine nicht ausreichend Grund für eine Besiedlung durch *C. perfringens*.

Ebenfalls für eine aktive Rolle von *C. perfringens* spricht, dass auch bei anderen Tierarten eine Schädigung der Darmwand durch besagtes Bakterium bekannt ist. So führt z. B. eine *C. perfringens*-Typ-A Infektion zu einer nekrotisierenden Enteritis bei Hühnern, eine Typ-B-Infektion zu gravierenden Ulzerationen im Dünndarm bei Lämmern und eine Typ-C-Infektion zu einer hochgradig nekrotisierenden und hämorrhagischen Enteritis mit Emphysemen und blutigen Ingesta bei Ferkeln.

Leider ergab die Typisierung mittels PCR keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar konnten bei 4/6 Patienten *cpe* nachgewiesen werden, jedoch war der Nachweis des Gens für Alpha-Toxin uneindeutig. Bei zwei Tieren konnte sogar keinerlei Gen für ein Toxin nachgewiesen werden. Dies ist ein sehr ungewöhnlicher

Befund, da in zahlreichen Studien bei unterschiedlichen Tierarten eigentlich immer eine Typisierung, sofern eine PCR durchgeführt wurde, anhand einer PCR auf Toxin-tragende-Gene möglich war (BADAGLIACCA et al., 2010). Bei Hunden stand dabei vor allem Typ A im Vordergrund (KRUTH et al., 1989; WERDELING et al., 1991).

Auch in dieser Studie scheint es sich bei mindestens vier Tieren um Typ A zu handeln, auch wenn der Nachweis von *cpa* nur schwach positiv war. Diese Vermutung wird durch die Tatsache erhärtet, dass es sich bei Typ A generell um den am weitesten verbreiteten Typen handelt, der auch beim Hund am häufigsten zu finden ist. Dennoch stellt sich die Frage, warum bei zwei Kulturen keine Gene für die Produktion von Toxinen zu finden waren und bei den vier anderen das Alpha-Toxin nur fraglich positiv gewertet werden konnte.

Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Primer nicht ideal für den Nachweis der Toxingene bei diesen Clostridien passten. Aufgrund der weltweiten Verbreitung von Clostridien und dem Vorkommen bei zahlreichen Säugetierspezies bestehen Unterschiede im Erbgut, die die Detektierbarkeit mittels PCR beeinflussen können.

Für ein falsch negatives Ergebnis spricht, dass es zwar Clostridien vom Typ A gibt, welche nur Alpha-Toxin ohne Enterotoxin produzieren (96 -97 %) (KOKAI-KUN et al., 1994), es jedoch andersherum bisher nicht bekannt ist. Schwieriger ist jedoch zu erklären, warum bei zwei der isolierten *C.-perfringens*-Stämme gar kein Toxigen nachgewiesen werden konnte.

Nach Behandlung (Primäranzucht, Selektion, Einfrieren, erneute Kultivierung) von *C.-perfringens*-Stämmen vom Serotyp B und C konnte eine Veränderung der DNA beobachtet werden. Bei diesen Serotypen kam es zu einem Verlust der Fähigkeit Toxine zu produzieren. Dies gilt jedoch bei Clostridien vom Typ A als eher unwahrscheinlich, da sie eine sehr stabiles Erbgut aufweisen (PETIT et al., 1999). Wahrscheinlicher erscheint eine Koexistenz von Toxin produzierenden Stämmen und Stämmen, die keine Toxinbildner sind. Dies könnte die schwach positive Reaktion des Alpha-Toxins erklären. Grundsätzlich ist zu überlegen, ob die Typisierung unter Verwendung anderer Primer oder eines anderen Protokolls in einer weiteren Studie erneut erfolgen sollte.

Bei allen vier *cpe*-positiven Hunden befand sich das Gen auf dem Plasmid.

Besonders in der Humanmedizin ist die Unterscheidung, ob cpe auf dem Plasmid oder auf dem Chromosom gefunden werden kann, sehr wichtig, da zwischen einer Lebensmittelintoxikation (Chromosom) und einer nicht von Lebensmitteln hervorgerufenen Clostridienenteritis, wie zum Beispiel einer Antibiotika assoziierten Diarrhoe oder einer sogenannten sporadischen Diarrhoe (Plasmid), unterschieden werden kann (CORNILLOT et al., 1995; COLLIE & MCCLANE, 1998). In dieser Studie ist somit eine Aufnahme durch verdorbenes Futter eher unwahrscheinlich. Vielmehr scheint eine Überwucherung der in der natürlichen Darmflora vorkommenden Clostridien vorzuliegen. Schon in vorangegangenen Studien wurde ein Ausbruch der Krankheit nach oraler Aufnahme von ungewohntem Futter oder Schnee vermutet. So zeigte VAN DER STEEN (1997), dass mit großen Mengen von Clostridien assoziierte akute Diarrhoe und nekrotische Enteritis bei Hunden häufig nach drastischen Wechseln des Proteingehaltes in der Nahrung auftraten (VAN DER STEEN et al., 1997). Auch in der Arbeit von UNTERER und Mitarbeiter (2011) berichteten 17,9 % der Besitzer der an akuter hämorrhagischer Diarrhoe erkrankten Hunde von einem voran gegangenen Futterwechsel (UNTERER et al., 2011).

In der vorliegenden Studie konnten keine Auffälligkeiten in der Fütterungsanamnese beobachtet werden. Es wurde von keinem der Besitzer berichtet, dass ein Futterwechsel stattgefunden hätte oder Ungewohntes und potentiell Reizendes, wie zum Beispiel Schnee, aufgenommen wurde. Keines der in der Studie aufgenommen Tiere hatte zuvor ein Antibiotikum erhalten. Da die Gabe von Antibiose vor der Endoskopie jedoch ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme war, ist diese Erhebung unter Vorbehalt zu betrachten. So ist es durchaus möglich, dass die Gabe von Antibiotika wie auch beim Menschen zu einer Dysbiose im Darm führen kann.

Mit dem Wissen aus der vorliegenden Studie, dass Clostridien im Krankheitsgeschehen bei Hunden mit AHDS eine Rolle spielen, wurde eine zweite retrospektive Studie durchgeführt. Es sollte untersucht werden, wie häufig CPE-codierende *C.-perfringens*-Stämme und Toxin-A und -B-codierende *C.-difficile*-Stämme sowie deren Toxine bei Hunden mit AHDS im Kot gefunden werden können. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob der positive Nachweis von Toxinen mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert.

In einigen Studien wurde der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von

Clostridien und Durchfall bei Hunden bereits evaluiert. Akuter blutiger Durchfall wurde dabei jedoch lediglich als Teilaspekt genannt und war meist nur mit geringen Fallzahlen vertreten. In den Studien von KRUTH und dessen Mitarbeitern (1989), WEESE und Mitarbeiter (2001), CAVE und Mitarbeiter (2002) und MARKS und Mitarbeiter (2002), die jedoch meist Hunde mit jeglicher Art von Durchfall mit gesunden Hunden verglichen hatten, wurde gezeigt, dass Clostridien und deren Toxine vermehrt bei Durchfallpatienten zu finden sind (KRUTH et al., 1989; WEESE et al., 2001; CAVE et al., 2002; MARKS et al., 2002). CAVE und Mitarbeiter (2002) sahen einen Zusammenhang zwischen CPE und *C.-difficile*-Toxin A und dem klinischen AHDS beim Hund. Jedoch ist die Aussagekraft dieser Studie aufgrund der kleinen Patientenzahl (8 Hunde) limitiert. Diese Resultate stehen im Widerspruch zu den Untersuchungen von MCKENZIE und Mitarbeitern (2010), die keinen Unterschied in Bezug auf das Vorkommen von CPE bei gesunden und Hunden mit Durchfall feststellen konnten (CAVE et al., 2002; MCKENZIE et al., 2010).

In der vorliegenden Studie konnte CPE bei Hunden mit AHDS signifikant häufiger im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden werden. Obwohl ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen im ELISA der Patienten- und der Kontrollgruppe festgestellt werden konnte, stellt sich dennoch die Frage, warum bei immerhin 31/54 der erkrankten Patienten der ELISA auf CPE negativ ausfiel. Zum einen muss man berücksichtigen, dass die Proben nicht frisch untersucht, sondern zunächst eingefroren wurden. Da über die Stabilität des Toxins in gefrorenem Zustand bisher keine Studien vorliegen, könnte das Vorhandensein von CPE sowohl bei der Patienten- als auch bei der Kontrollgruppe unterschätzt worden sein. Zusätzlich ist der Test zwar beim Menschen verlässlich, jedoch nicht für den Hund etabliert worden, sodass keine Aussagen in Bezug auf Sensitivität und auch Spezifität getroffen werden können. Folglich ist es ebenfalls möglich, dass der ELISA erst ab einer bestimmten Konzentration von CPE im Kot positiv ausfällt. Aufgrund des signifikanten Unterschiedes scheint das CPE in jedem Fall eine Rolle im Krankheitsgeschehen zu spielen. Dabei kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob es primär als auslösende Ursache agiert oder vielmehr sekundär aufgrund einer Clostridienüberwucherung in hoher Konzentration vorhanden ist.

Der Nachweis sowohl von cpe mittels PCR erbrachte in dieser Studie einen

statistischen Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe. Damit entspricht dieses Ergebnis dem von MARKS und Mitarbeitern (2002), die ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von cpe und Durchfall und CPE und Durchfall feststellen konnten (KRUTH et al., 1989; WEESE et al., 2001; CAVE et al., 2002; MARKS et al., 2002). Laut deren Aussage erhöht sich der Verdacht für das Vorliegen einer Clostridien assoziierten Durchfallerkrankung, wenn der CPE-Nachweis gemeinsam mit dem cpe-Nachweis positiv ausfällt. In dieser Studie lässt sich jedoch kein Vorteil eine Kombination beider Tests nachweisen. Dies ist damit zu erklären, dass in der Studie von MARKS und Mitarbeitern bei einigen CPE positiven Tieren kein cpe gefunden wurde. In diesen Fällen ging man davon aus, dass es sich um falsch positive CPE-Resultate handelte. Durch die Kombination beider Tests zur Diagnosestellung einer Clostridieninfektion fallen somit diese falsch positiven Fälle weg. In der vorliegenden Studie konnte bei jedem positiven CPE-Nachweis auch cpe nachgewiesen werden. Dadurch erlangte die Kombination beider Tests keinen Vorteil vor dem CPE-Nachweis.

Immerhin 9/23 der gesunden Tiere beherbergten ebenfalls cpe-tragende Clostridien als Teil ihrer physiologischen Darmflora. Dies legt die Vermutung nahe, dass grundsätzlich das Vorhandensein von cpe-tragenden Clostridien keine negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand des Tieres hat, sondern dass cpe-tragende Bakterien einen Teil der physiologischen Dickdarmflora darstellen. Erst bei Eintritt eines bestimmten Ereignisses scheint es zu einer vermehrten Exprimierung von CPE zu kommen.

Toxin A und B von *C. difficile* konnten mittels ELISA bei keinem der 23 Kontrollhunde gefunden werden. Dies wurde auch in den Studien von WEESE und Mitarbeitern (2001), MARKS und Mitarbeitern (2002) und CAVE und Mitarbeitern (2002) beobachtet (KRUTH et al., 1989; WEESE et al., 2001; CAVE et al., 2002; MARKS et al., 2002). Allerdings war der Toxinnachweis in der vorliegenden Studie lediglich bei zweien aus der erkrankten Gruppe positiv, sodass kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zustande kam. Dies steht im Widerspruch zu MARKS und Mitarbeitern (2002), die zwar ebenfalls nur bei knapp 13 % der an Durchfall erkrankten Tiere Toxin A mittels ELISA nachwiesen, jedoch damit einen signifikanten Unterschied zur gesunden Population feststellen konnten. Der Nachweis des Gens für Toxin B (tcdB) fiel

mit 18,5 % höher als der Nachweis des Gens für Toxin A aus, war jedoch ebenfalls nicht signifikant zwischen der Gruppe der erkrankten und der der gesunden Hunde. Dies deckt sich mit den Studien von MARKS und Mitarbeiter (2002) und CAVE und Mitarbeitern (2002). In mehreren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Gabe von Antibiotika und dem Ausbruch einer von Clostridien verursachten Enteritis gesehen werden (BORRIELLO et al., 1984; ALCANTARA & GUERRANT, 2000; SPARKS et al., 2001). Besonders  $\beta$ -Laktamantibiotika und Lincosamide scheinen bei Menschen und Pferden mit dem Ausbruch von Diarrhoe vergesellschaftet zu sein (BORRIELLO et al., 1984; KLINGLER et al., 2000; HARBARTH et al., 2001). In der vorliegenden Studie waren nur fünf Hunde mit unterschiedlichen Antibiotika vorbehandelt worden. Bei keinem dieser Tiere konnte Toxin A oder B oder tcdB von *C. difficile* nachgewiesen werden. Nur bei einem Tier war die PCR für cpe positiv. Folglich konnte kein Zusammenhang zwischen Antibiotikagabe und Diarrhoe nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Untergruppen innerhalb der Gruppe der erkrankten Tiere zwischen CPE-positiven und -negativen und zwischen cpe-positiven und -negativen ließ keinerlei Unterschiede erkennen. Sowohl klinische Parameter, wie der AHDS-Index, als auch die Dauer des Aufenthaltes zeigten genauso wenig Unterschiede zwischen den Untergruppen wie die Blutparameter. Man kann somit sagen, dass der Nachweis von cpe und CPE keinerlei Prognose über die Krankheitsentwicklung zulässt und auch die Therapie nicht an einen positiven oder negativen Nachweis von cpe oder CPE angepasst werden muss.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Der bisher in der Literatur häufig verwendete Begriff „Hämorrhagische Gastroenteritis“ bezeichnet ein Syndrom, welches durch akuten blutigen Durchfall, einhergehend mit starkem Flüssigkeitsverlust, gekennzeichnet ist. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist nach wie vor unbekannt. Lediglich pathologische Untersuchungen an wenigen verstorbenen Tieren gaben bislang Hinweise auf die makroskopischen und histologischen Veränderungen.

Ziel der Endoskopiestudie war, akut erkrankte Tiere während des Krankheitsgeschehens zu endoskopieren und Biopsien zu entnehmen, um eine realistische Einschätzung der makroskopischen und histologischen Veränderungen zu erhalten und *intra vitam* im Dünndarm vorkommende Bakterien während des Krankheitsgeschehens zu identifizieren. Hierfür wurden zehn Hunde mit akuter Symptomatik (< drei Tage), bei denen keine bekannte Ursache (z. B. Parasiten, Parvovirose, Pankreatitis, Gerinnungsstörungen, Organversagen oder gastrointestinale Fremdkörper) für den blutigen Durchfall gefunden werden konnte, in die Studie aufgenommen. Gleichzeitig dienten Darmbiopsien von elf Hunden mit chronischen gastrointestinalen Symptomen oder mit Verdacht auf Fremdkörper als Kontrollgruppe für den histologischen und bakteriologischen Nachweis von Bakterien im Dünndarm.

Die Untersuchungen erbrachten, dass sich die akuten Läsionen, wie Hyperämie, erhöhte Vaskularität, Blutungen und Erosionen, auf Dünn- und Dickdarm beschränkten. Der Magen hingegen wies keine Anzeichen eines akuten Entzündungsgeschehens auf. Der Schweregrad der endoskopischen und histologischen Läsionen in Dünn- und Dickdarm war individuell verschieden, reichte von mild bis hochgradig und war teils im Dünn-, und teils im Dickdarm stärker ausgeprägt. Zusätzlich konnten, im Gegensatz zu den Kontrolltieren bei denen nur bei einem Hund eine geringe Anzahl an *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) bakteriologisch angezüchtet wurde, bei allen Patienten *C. perfringens* entweder bakteriologisch oder immunhistologisch im Dünndarm nachgewiesen werden.

Das Ziel der Toxinstudie war es, anhand einer größeren Anzahl von an akutem hämorrhagischen Diarrhoe-Syndrom (AHDS) erkrankten Hunden (54 Tiere), die

Häufigkeit von Enterotoxin-codierenden *C.-perfringens*-Stämmen und Toxin-B-codierenden *Clostridium-difficile*-Stämmen (*C. difficile*) sowie deren Toxine *C.-perfringens*-Enterotoxin (CPE) und Toxin B im Kot zu bestimmen und dies mit einer Kontrollgruppe (23 Tiere) zu vergleichen. Zusätzlich sollte beurteilt werden, ob hinsichtlich Klinik und Laborveränderungen ein Unterschied zwischen AHDS-Patienten mit positivem und negativem Nachweis von Clostridientoxinen sowie Toxin-Genen im Kot vorliegt.

Durch die Ergebnisse dieser Studie erhärtete sich der Verdacht auf eine Beteiligung von *C. perfringens* bei der Entstehung von blutigem Durchfall. Im Vergleich zu gesunden Tieren konnte bei Hunden mit AHDS signifikant häufiger CPE und auch *C.-perfringens*-Enterotoxinen (cpe) im Kot gefunden werden. *C. difficile* scheint bei diesem Krankheitsgeschehen keine signifikante Rolle zu spielen. Toxin-codierende *C.-difficile*-Stämme und deren Toxine konnten sowohl bei den Patienten wie auch bei den Kontrolltieren nur sehr selten gefunden werden.

Der CPE-Nachweis mit dem derzeit kommerziell verfügbaren ELISA im Kot scheint keinen Vorteil zu bringen, da ein positives Ergebnis nicht mit dem klinischen Verlauf korreliert. Zusätzlich konnte kein Unterschied hinsichtlich des Schweregrades der Erkrankung, der Dauer des stationären Klinikaufenthaltes und relevanter Laborparameter zwischen Hunden mit positivem und negativem Nachweis sowohl von CPE als auch von cpe festgestellt werden.

Durch die Endoskopiestudie wurden erstmals die *intra vitam* entstandenen makroskopischen und histologischen Veränderungen bei Patienten mit AHDS beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Schleimhautläsionen lediglich auf den Darm beschränken. Aus diesem Grund sollte der Begriff „Hämorrhagische Gastroenteritis“, der eine Beteiligung des Magens impliziert, durch den Begriff „Akutes Hämorrhagisches Diarrhoe-Syndrom“ ersetzt werden. Aufgrund des signifikant häufigeren histologischen und kulturellen Nachweises von *C. perfringens* im Dünndarm von Patienten im Gegensatz zu den Kontrolltieren konnte gezeigt werden, dass dieser Keim am Krankheitsgeschehen des AHDS beteiligt ist. Welche Toxine für die Läsionen verantwortlich sind und weshalb es zu einer Überwucherung mit *C. perfringens* im Darm kommt, muss durch weitere Studien geklärt werden.



## VII. SUMMARY

„Haemorrhagic Gastroenteritis“, a synonym often found in veterinary literature, describes a syndrome of acute haemorrhagic diarrhoea accompanied by significant fluid loss. The etiology of this syndrome is to date unknown. Only a few post-mortem examinations have been carried out and only limited data on macroscopic and histologic findings are available.

The goal of the endoscopy study was to perform endoscopies, including endoscopic biopsies, on acutely diseased animals to collect data on macroscopic and microscopic changes, as well as to identify the bacterial microflora during the acute course of the disease within the small intestine. Ten dogs with acute haemorrhagic diarrhoea (lasting less than three days) without an identifiable cause (e.g. parasites, parvovirus, pancreatitis, coagulopathies, multi-organ failure or gastrointestinal foreign bodies) were included in the study. As a control group 11 dogs with chronic gastrointestinal disease or gastrointestinal foreign bodies were used.

The investigation showed that acute lesions such as hyperemia, increased vascularity, bleeding and erosions were limited to the small and large intestines. In contrast, patients' stomachs did not show any signs of acute inflammation. The severity of the macroscopic and microscopic lesions varied; severity ranged from mild to severe, and lesions were more severe either in the small or in the large intestine without any preference for one or the other. In addition, *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) was found within the small intestines of all study dogs, either by culture or immunohistopathology, compared with only one control dog. In this dog only small numbers of *C. perfringens* could be cultured.

The goal of the toxin study was to record the occurrence of enterotoxigenic *C. perfringens* and toxin-B positive *Clostridium difficile* (*C. difficile*) strains as well as their toxins, *C. perfringens* enterotoxin (CPE) and toxin B, respectively, in the faeces of 54 dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome (AHDS), and to compare it with 23 control dogs. Furthermore, it was to be evaluated whether there was any difference in clinical symptoms and laboratory parameters between AHDS-patients testing positive or negative for faecal clostridial toxins or their genes.

The results of this study strongly suggest a causal relationship between *C. perfringens* and the occurrence of acute haemorrhagic diarrhoea. Compared with the healthy control group, dogs with ADHS tested positive for faecal CPE and *C. perfringens* enterotoxin genes (cpe) significantly more frequently. *C. difficile* appears to play no significant role in this disease. Toxin-coding *C. difficile* strains as well as their toxins were only rarely found in study and control dogs.

Detection of faecal CPE by a commercially available ELISA is not useful, as a positive result did not correlate with the clinical course. Additionally, no differences in regard to disease severity, length of hospitalization or relevant laboratory parameters between positively and negatively tested dogs for CPE and cpe were detected.

This was the first study to describe *intra vitam* macroscopic and histopathologic changes in patients with ADHS. It could be shown that mucosal lesions are limited to the intestines. As a consequence, „haemorrhagic gastroenteritis“, as it is often used in current literature and implying involvement of the stomach, should be re-named to „acute haemorrhagic diarrhoea syndrome“. It was also shown that *C. perfringens* is causally related to ADHS as it was detected significantly more frequently in the small intestines of diseased patients than in the control group either by culture or histopathology. Which toxins are responsible for mucosal lesions in patients and what leads to an overgrowth of *C. perfringens* has to be determined by further studies.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aichelman WW, Brown GD, Griner LA. Clostridium perfringens type D (epsilon) enterotoxemia in Brown Swiss dairy calves. J Am Vet Med Assoc 1956; 129: 375-6.

Alcantara CS, Guerrant RL. Update on Clostridium difficile infection. Curr Gastroenterol Rep 2000; 2: 310-4.

Allenspach K, Rufenacht S, Sauter S, Grone A, Steffan J, Strehlau G, Gaschen F. Pharmacokinetics and clinical efficacy of cyclosporine treatment of dogs with steroid-refractory inflammatory bowel disease. J Vet Intern Med 2006; 20: 239-44.

Badagliacca P, Di Provvido A, Scattolini S, Pompei G, Di Giannatale E. Toxin genotyping of Clostridium perfringens strains using a polymerase chain reaction protocol. Veterinaria Italiana 2010; 46: 113-8.

Bains BS. Necrotic enteritis of chickens. Aust Vet J 1968; 44: 40.

Baker E. Food allergy. Vet Clin North Am 1974; 4: 775-7.

Barth H, Pfeifer G, Hofmann F, Maier E, Benz R, Aktories K. Low pH-induced formation of ion channels by clostridium difficile toxin B in target cells. J Biol Chem 2001; 276: 10670-6.

Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. Microbiol Mol Biol Rev 2004; 68: 373-402, table of contents.

Bartlett ML, Walker HW. Use of dogs as an assay for Clostridium perfringens enterotoxin. Applied Microbiology 1972; 23: 196-7.

Baums CG, Schotte U, Amtsberg G, Goethe R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol* 2004; 100: 11.6.

Baverud V, Gustafsson A, Franklin A, Lindholm A, Gunnarsson A. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J* 1997; 29: 279-84.

Benno Y, Nakao H, Uchida K, Mitsuoka T. Impact of the advances in age on the gastrointestinal microflora of beagle dogs. *J Vet Med Sci* 1992; 54: 703-6.

Berry PR, Rodhouse JC, Hughes S, Bartholomew BA, Gilbert RJ. Evaluation of ELISA, RPLA, and Vero cell assays for detecting *Clostridium perfringens* enterotoxin in faecal specimens. *J Clin Pathol* 1988; 41: 458-61.

Bhown AS, Habeeb AF. Structural studies on epsilon-prototoxin of *Clostridium perfringens* type D. Localization of the site of tryptic scission necessary for activation to epsilon-toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 78: 889-96.

Blocker D, Behlke J, Aktories K, Barth H. Cellular uptake of the *Clostridium perfringens* binary iota-toxin. *Infect Immun* 2001; 69: 2980-7.

Borriello SP, Larson HE, Welch AR, Barclay F, Stringer MF, Bartholomew BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea. *Lancet* 1984; 1: 305-7.

Borriello SP. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 Suppl C: 13-9.

Bos J, Smithee L, McClane B, Distefano RF, Uzal F, Songer JG, Mallonee S, Crutcher JM. Fatal necrotizing colitis following a foodborne outbreak of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A infection. *Clin Infect Dis* 2005; 40: e78-83.

Bounous G, Hampson LG, Gurd FN. Cellular Nucleotides in Hemorrhagic Shock: Relationship of Intestinal Metabolic Changes to Hemorrhagic Enteritis and the Barrier Function of Intestinal Mucosa. *Ann Surg* 1964; 160: 650-68.

Branton SL, Reece FN, Hagler WM. Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 1987: 1326-30.

Brynstad S, Granum PE. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int J Food Microbiol* 2002: 195-202.

Burrows C. Canine hemorrhagic gastroenteritis. *J Am Anim Hosp Assoc* 1977; 13: 451-8.

Buxton D, Morgan KT. Studies of lesions produced in the brains of colostrum deprived lambs by *Clostridium welchii* (*Cl. perfringens*) type D toxin. *J Comp Pathol* 1976; 86: 435-47.

Buxton D, Linklater KA, Dyson DA. Pulpy kidney disease and its diagnosis by histological examination. *Vet Rec* 1978; 102: 241.

Carroll CL, Hazard G, Coloe PJ, Hooper PT. Laminitis and possible enterotoxaemia associated with carbohydrate overload in mares. *Equine Vet J* 1987; 19: 344-6.

Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 221: 52-9.

Chakrabarti G, Zhou R, McClane B. Death pathways activated in CaCo-2 cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Infect Immun* 2003: 4260-70.

Chouicha N, Marks SL. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in

dogs. J Vet Diagn Invest 2006; 18: 182-8.

Clooten JK, Kruth SA, Weese JS. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. J Vet Intern Med 2003; 17: 123; author reply

Collee JG. *Clostridium perfringens* (Cl. welchii) in the human gastro-intestinal tract. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 1974; 3: 205-19.

Collie RE, McClane BA. Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in *Clostridium perfringens* isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases. J Clin Microbiol 1998; 36: 30-6.

Cornillot E, Saint-Joanis B, Daube G, Katayama S, Granum PE, Canard B, Cole ST. The enterotoxin gene (cpe) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. Mol Microbiol 1995; 15: 639-47.

Craig JP, Miles AA. Some properties of the iota-toxin of *Clostridium welchii*, including its action on capillary permeability. J Pathol Bacteriol 1961; 81: 481-93.

Czczulin JR, Hanna PC, McClane BA. Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. Infect Immun 1993; 61: 3429-39.

Daube G, China B, Simon P, Hvala K, Mainil J. Typing of *Clostridium perfringens* by in vitro amplification of toxin genes. J Appl Bacteriol 1994; 77: 650-5.

Davis CP, Cleven D, Balish E, Yale CE. Bacterial association in the gastrointestinal tract of beagle dogs. Appl Environ Microbiol 1977; 34: 194-206.

Dickie CW, Klinkerman DL, Petrie RJ. Enterotoxemia in two foals. J Am Vet Med Assoc 1978; 173: 306-7.

Donaldson MT, Palmer JE. Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. J Am Vet Med Assoc 1999; 215: 358-61.

Duffy LK, McDonel JL, McClane BA, Kurosky A. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin: characterization of the amino-terminal region. Infect Immun 1982; 38: 386-8.

Duncan CL, Strong DH. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. J Bacteriol 1969; 100: 86-94.

Eggert E. Über eine mit *Bac. enterotoxicus* erzeugte Darmerkrankung beim Hund. 1950;

El-Seedy FR. Studies on necrotic enteritis in chickens Vet. Med. J. Giza 1990; 38: 407-17.

Finnie JW. Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. J Comp Pathol 1984a; 94: 445-52.

Finnie JW. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. J Comp Pathol 1984b; 94: 363-70.

Frank FW. *Clostridium perfringens* type B from enterotoxemia in young ruminants. Am J Vet Res 1956; 17: 492-4.

Fukata T, Hadate Y, Baba E, Arakawa A. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. Avian Dis 1991; 35: 224-7.

García-Sancho M, Rodríguez- Franco F, Sainz A, Rodríguez A. Evaluation of clinical, macroscopic and histopathologic response to Treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic Enteritis. J Vet Intern

Med 2007; 21: 11-27.

Gardner DE. Pathology of *Clostridium welchii* type D enterotoxaemia. 3. Basis of the hyperglycaemic response. J Comp Pathol 1973; 83: 525-9.

Gibert M, Jolivet-Reynaud C, Popoff MR. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. Gene 1997; 203: 65-73.

Ginter A, Williamson ED, Dessy F, Coppe P, Bullifent H, Howells A, Titball RW. Molecular variation between the alpha-toxins from the type strain (NCTC 8237) and clinical isolates of *Clostridium perfringens* associated with disease in man and animals. Microbiology 1996; 142 ( Pt 1): 191-8.

Griner LA, Bracken FK. *Clostridium perfringens* (type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves. J Am Vet Med Assoc 1953; 122: 99-102.

Griner LA, Johnson HW. *Clostridium perfringens* type C in hemorrhagic enterotoxemia of lambs. J Am Vet Med Assoc 1954; 125: 125-7.

Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 321-32.

Gurjar A, Hegde N, Love B, Jayarao B. Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxinotyping of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle. Mol Cell Probes 2008; 2: 90-5.

Habermann E. [On the toxicology and pharmacology of gas gangrene toxin (*Clostridium welchii* type A) and its components]. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 1960; 238: 502-24.

Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am J Dis Child 1935; 49: 390-402.



Harbarth S, Samore M, Carmeli Y. Antibiotic prophylaxis and the risk of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *J Hosp Infect* 2001; 48: 93-7.

Hart S, Hooper PT. Enterotoxemia of calves due to *Clostridium welchii* type E. *Aust Vet J* 1967; 62: 360-3.

Hartley WJ. A focal encephalomalacia of lambs. *N Z Vet J* 1956; 4: 129-35.

Hatheway CL. Toxigenic *Clostridia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3: 66-96.

Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Carter GP, Minton NP. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods* 2007; 70: 452-64.

Helmboldt CF, Bryant ES. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. *Avian Dis* 1971; 15: 775-80.

Hill FWG. Acute intestinal haemorrhage syndrome in dogs. *the Vet Ann.* 1972: 98-101.

Hogenauer C, Hammer HF, Krejs GJ, Reisinger EC. Mechanisms and management of antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 702-10.

Hogh P. The occurrence in Denmark of necrotizing enteritis in piglets caused by *Clostridium perfringens* type C. *Bull Off Int Epizoot* 1967; 67: 1351-9.

Houser B, Hattel A, Jayarao B. Real-time multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Clostridium difficile*. *Foodborne Pathog Dis* 2010; 7: 719-26.

Howard-Martin M, Morton RJ, Qualls CW, Jr., MacAllister CG. *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in a newborn foal. *J Am Vet Med Assoc* 1986; 189: 564-5.

Hsieh HV, Archer J, Davis JP, Nielsen CF (2009) Clostridium perfringens infection among inmates at a county jail. In: MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. . 138-41

Hunter SE, Brown JE, Oyston PC, Sakurai J, Titball RW. Molecular genetic analysis of beta-toxin of Clostridium perfringens reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of Staphylococcus aureus. Infect Immun 1993; 61: 3958-65.

Jank T, Giesemann T, Aktories K. Rho-glucosylating Clostridium difficile toxins A and B: new insights into structure and function. Glycobiology 2007; 17: 15R-22R.

Jank T, Aktories K. Structure and mode of action of clostridial glycosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol 2008; 16: 222-9.

Jansen BC. The production of a basic immunity against pulpy kidney disease. Onderstepoort J Vet Res 1967; 34: 65-79.

Jhung MA, Thompson AD, Killgore GE, Zukowski WE, Songer G, Warny M, Johnson S, Gerding DN, McDonald LC, Limbago BM. Toxinotype V Clostridium difficile in humans and food animals. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1039-45.

Johannsen U, Erwerth W, Kunz G, Kohler B. [Clostridium perfringens type C enterotoxemia (necrotizing enteritis) in suckling pigs. 1. Study of the experimental production of disease by Clostridium perfringens type C poisoning and infection (experimental set-up, clinical aspects, pathological findings)]. Arch Exp Veterinarmed 1986a; 40: 811-25.

Johannsen U, Menger S, Erwerth W, Kohler B. [Clostridium perfringens type C enterotoxemia (necrotizing enteritis) in suckling pigs. 2. Light and electron microscopic studies of the pathology and pathogenesis of experimental Clostridium perfringens type C toxin poisoning]. Arch Exp Veterinarmed 1986b; 40: 881-94.

Johnson S, Gerding D. Enterotoxemic infections. In: The Clostridia. Molecular Biology and Pathogenesis. Rood JJ, McClane B, Songer JG, Titball RW, eds. London: Academic Press 1997: 117-40.

Jolivet-Reynaud C, Popoff M, Vinit MA, Ravisse P, Moreau H, Alouf JE. Enteropathogenicity of *Clostridium perfringens* beta toxin and other clostridial toxins. Zbl. Bakteriologie. 1986: 145-51.

Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. J Biol Chem 1995a; 270: 13932-6.

Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. Nature 1995b; 375: 500-3.

Katahira J, Inoue N, Horiguchi Y, Matsuda M, Sugimoto N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. J Cell Biol 1997; 136: 1239-47.

Kather EJ, Marks SL, Foley JE. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance genes in canine *Clostridium perfringens* isolates. Vet Microbiol 2006; 113: 97-101.

Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile* infection. Annu. Rev. Med. 1998; 49: 375-90.

Klingler PJ, Metzger PP, Seelig MH. *Clostridium difficile* infection: risk factors, medical and surgical management. Dig Dis 2000; 18: 147-60.

Knoop FC, Owens M, Crocker IC. *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 251-65.

Kokai-Kun JF, Songer JG, Czczulin JR, Chen F, McClane BA. Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol 1994; 32: 2533-9.

Kruth SA, Prescott JF, Welch MK, Brodsky MH. Nosocomial diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection in dogs. J Am Vet Med Assoc 1989; 195: 331-4.

Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A, Minton NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. Nature 2010; 467: 711-3.

Lefebvre SL, Arroyo LG, Weese JS. Epidemic *Clostridium difficile* strain in hospital visitation dog. Emerg Infect Dis 2006; 12: 1036-7.

Lloyd-Evans LP. Haemorrhagic gastroenteritis in the dog. Vet Rec 1978; 103: 247-8.

Long JR. Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. Can J Comp Med 1973; 37: 302-8.

Lyerly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect Immun 1985; 47: 349-52.

Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 1-18.

Lyerly DM, Neville LM, Evans DT, Fill J, Allen S, Greene W, Sautter R, Hnatuck P, Torpey DJ, Schwalbe R. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. J Clin Microbiol 1998; 36: 184-90.

Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, Poon R, Adams V, Vedantam G, Johnson S, Gerding DN, Rood JI. Toxin B is essential

for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 2009; 458: 1176-9.

Mackinnon JD. Enterotoxaemia caused by *Clostridium perfringens* Type C Pig  
*Vet J* 1989; 119-22.

Marks SL, Melli A, Kass PH, Jang SS, Barkhoodarian A, Hirsh DC. Evaluation of methods to diagnose *Clostridium perfringens*-associated diarrhea in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214: 357-60.

Marks SL, Kather EJ, Kass PH, Melli AC. Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 533-40.

Marks SL, Kather EJ. Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Vet Microbiol* 2003; 94: 39-45.

Marks SL, Rankin SC, Byrne MD, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment and control. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 1195-208.

Matsuda T, Okada Y, Inagi E, Tanabe Y, Shimizu Y, Nagashima K, Sakurai J, Nagahama M, Tanaka S. Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult. *Pathol Int* 2007; 57: 622-6.

McClane B (2001a) *Clostridium perfringens*. In: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. Eds Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. ASM Press, Washington DC. 351-72

McClane B (2007) *Clostridium perfringens*, 3rd edn. ASM Press, Washington, D.C.

McClane BA, Wnek AP. Studies of *Clostridium perfringens* enterotoxin action at

different temperatures demonstrate a correlation between complex formation and cytotoxicity. *Infect Immun* 1990; 58: 3109-15.

McClane BA. Clostridium perfringens enterotoxin acts by producing small molecule permeability alterations in plasma membranes. *Toxicology* 1994; 87: 43-67.

McClane BA. Clostridium perfringens enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol* 2000; 8: 145-6.

McClane BA. The complex interactions between Clostridium perfringens enterotoxin and epithelial tight junctions. *Toxicon* 2001b; 39: 1781-91.

McClane BA, Chakrabarti G. New insights into the cytotoxic mechanisms of Clostridium perfringens enterotoxin. *Anaerobe* 2004; 10: 107-14.

McDonel JL, Duncan CL. Histopathological effect of Clostridium perfringens enterotoxin in the rabbit ileum. *Infect Immun* 1975; 12: 1214-8.

McDonel JL, Duncan CL. Regional localization of activity of Clostridium perfringens type A enterotoxin in the rabbit ileum, jejunum, and duodenum. *J Infect Dis* 1977; 136: 661-6.

McDonel JL, Chang LW, Pounds JG, Duncan CL. The effects of Clostridium perfringens enterotoxin on rat and rabbit ileum: an electron microscopic study. *Lab Invest* 1978; 39: 210-8.

McDonel JL. Binding of Clostridium perfringens [125I]enterotoxin to rabbit intestinal cells. *Biochemistry* 1980a; 19: 4801-7.

McDonel JL. Clostridium perfringens toxins (type A, B, C, D, E). *Pharmacol Ther* 1980b; 10: 617-55.

McFarland LV. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 2009; 15: 274-80.

McGowan B, Moulton JE, Rood SE. Lamb losses associated with *Clostridium perfringens* type A. *J Am Vet Med Assoc* 1958; 133: 219-21.

McKenzie E, Riehl J, Banse H, Kass PH, Nelson S, Jr., Marks SL. Prevalence of diarrhea and enteropathogens in racing sled dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24: 97-103.

Mead PS, Slutsker L. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999: 607-25.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG, Slauson DG. Pathogenesis of Canine Parvovirus Enteritis: The Importance of Viremia. *Vet Pathol* 1985; 22: 60-71.

Miclard J, Jaggi M, Sutter E, Wyder M, Grabscheid B, Posthaus H. *Clostridium perfringens* beta-toxin targets endothelial cells in necrotizing enteritis in piglets. *Vet Microbiol* 2009; 137: 320-5.

Mollby R, Thelestam M, Wadstrom T. Effect of *Clostridium perfringens* phospholipase C(alpha-toxin) on the human diploid fibroblast membrane. *J Membr Biol* 1974; 16: 313-30.

Moon HW, Bergeland ME. *Clostridium perfringens* Type C enterotoxemia of the newborn pig. *Can Vet J* 1965; 6: 159-61.

Mumford DH. Enterotoxemia in cattle. *Aust Vet J* 1961; 37: 122-6.

Nagahama M, Nagayasu K, Kobayashi K, Sakurai J. Binding component of *Clostridium perfringens* iota-toxin induces endocytosis in Vero cells. *Infect Immun* 2002; 70: 1909-14.

Nagahama M, Hayashi S, Morimitsu S, Sakurai J. Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 36934-41.

Nairn ME, Bamford VW. Necrotic enteritis of broiler chickens in western Australia. *Aust Vet J* 1967; 43: 49-54.

Niilo L, Harries WN, Jones GA. *Clostridium perfringens* type C in hemorrhagic enterotoxemia of neonatal calves in Alberta. *Can Vet J* 1974; 15: 224-6.

Niilo L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Can Vet J* 1980; 21: 141-8.

Niilo L. Toxigenic characteristics of *Clostridium perfringens* type C in enterotoxemia of domestic animals. *Can J Vet Res* 1987; 51: 224-8.

Niilo L. *Clostridium perfringens* Type C Enterotoxemia. *Can Vet J* 1988; 29: 658-64.

Niilo L. *Clostridium perfringens*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2 edn. Gyles CL, Thoen CO, eds.: Iowa State University Press 1993: 114-23.

Ohnuna Y, Kondo H, Saino H, Taguchi M, Ohno A, Matsuda T. Necrotic enteritis due to newborn piglets in caused by *Clostridium perfringens* Typ C. *J. Jpn. Vet. Med Assoc.* 1992: 738-41.

Ohsaka A, Tsuchiya M, Oshio C, Miyairi M, Suzuki K, Yamakawa Y. Aggregation of platelets induced by alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens* administered topically and intravenously [proceedings]. *Jpn J Med Sci Biol* 1978; 31: 220.

Oxer DT. Enterotoxaemia in goats. *Aust Vet J* 1956; 32: 62-6.



Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh E. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243: 141-7.

Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* 1997; 65: 1402-7.

Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol* 1999; 7: 104-10.

Petrillo TM, Beck-Sague CM, Songer JG, Abramowsky C, Fortenberry JD, Meacham L, Dean AG, Lee H, Bueschel DM, Nesheim SR. Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *N Engl J Med* 2000; 342: 1250-3.

Pillai A, Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD004611.

Popoff MR. Bacteriological examination in enterotoxaemia of sheep and lamb. *Vet Rec* 1984; 114: 324.

Popoff MR, Jestin A. Enteropathogenicity of purified *Clostridium perfringens* enterotoxin in the pig. *Am J Vet Res* 1985; 46: 2147-8.

Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 1988; 56: 2299-306.

Prescott JF, Johnson JA, Patterson JM, Bulmer WS. Haemorrhagic gastroenteritis in the dog associated with *Clostridium welchii*. *Vet Rec* 1978; 103: 116-7.

Ratz F, Szabo E, Szentmiklossy E. Observations on the pathomorphology of necrotic enteritis in chickens. *Magy. Allatorv. Lapja* 1989; 44: 133-40.

Roberts RS (1958) Clostridial diseases. In: Diseases due to bacteria. Eds Stableforth AW, Galloway IA, Academic Press New York

Robertson SL, Smedley JG, 3rd, Singh U, Chakrabarti G, Van Itallie CM, Anderson JM, McClane BA. Compositional and stoichiometric analysis of Clostridium perfringens enterotoxin complexes in Caco-2 cells and claudin 4 fibroblast transfectants. Cell Microbiol 2007; 9: 2734-55.

Rupnik M, Dupuy B, Fairweather NF, Gerding DN, Johnson S, Just I, Lyerly DM, Popoff MR, Rood JJ, Sonenshein AL, Thelestam M, Wren BW, Wilkins TD, von Eichel-Streiber C. Revised nomenclature of Clostridium difficile toxins and associated genes. J Med Microbiol 2005; 54: 113-7.

Russell WC. Type A enterotoxemia in captive wild goats. J Am Vet Med Assoc 1970; 157: 643-6.

Sakurai J, Duncan CL. Purification of beta-toxin from Clostridium perfringens type C. Infect Immun 1977; 18: 741-5.

Sakurai J, Duncan CL. Some properties of beta-toxin produced by Clostridium perfringens type C. Infect Immun 1978; 21: 678-80.

Sakurai J, Fujii Y. Purification and characterization of Clostridium perfringens beta toxin. Toxicon 1987; 25: 1301-10.

Sakurai J, Nagahama M, Oda M, Tsuge H, Kobayashi K. Clostridium perfringens Iota-Toxin: Structure and Function. Toxins (Basel) 2009; 1: 208-28.

Sasaki J, Goryo M, Asahina M, Makara M, Shishido S, Okada K. Hemorrhagic enteritis associated with Clostridium perfringens type A in a dog. J Vet Med Sci 1999; 61: 175-7.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ. Foodborne illness acquired in the United

---

States - major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 7-15.

Schreiner NM, Gaschen F, Grone A, Sauter SN, Allenspach K. Clinical signs, histology, and CD3-positive cells before and after treatment of dogs with chronic enteropathies. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 1079-83.

Shakir F, Thompson D, Marlar R, Ali T. A Novel Use of Rectal Swab Test for *Clostridium difficile* Infection by Real-Time PCR. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 1444-5.

Shandera PS, Tacket CO, Blake PA. Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *J Infect Dis* 1983;

Sherman S, Klein E, McClane BA. *Clostridium perfringens* type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. *J Diarrhoeal Dis Res* 1994; 12: 200-7.

Slee A. Haemorrhagic gastroenteritis in a dog *Vet Rec* 1979; 104: 14-5.

Smith LA, Williams BL (1984) *The pathogenic anaerobic bacteria*, 3rd edn. Charles C Thomas, Springfield, Ill.

Smith LD. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Rev Infect Dis* 1979; 1: 254-62.

Songer JG, Hunter SE, Chen F (1993) PCR method for detection of alpha, beta and epsilon toxin genes of *Clostridium perfringens*. In: 74th Annu. Meet. Conf. Res. Workers Anim. Dis.

Songer JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 216-34.

Songer JG. Clostridial disease of small ruminants. *Vet. Res.* 1998; 29: 219-32.

Songer JG, Uzal F. Clostridial enteric infections in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 2005; 17: 528-36.

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. J Cell Biol 1999; 147: 195-204.

Sparks SG, Carman RJ, Sarker MR, McClane BA. Genotyping of enterotoxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. J Clin Microbiol 2001; 39: 883-8.

Spielman B. Hemorrhagic gastroenteritis in 15 dogs. Journal of the American Animal Hospital Association 1993; 29: 341-4.

Steinthorsdottir V, Halldorsson H, Andresson OS. Clostridium perfringens beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells. Microb Pathog 2000; 28: 45-50.

Sterne M, Thomson A. The isolation and identification of clostridia from pathological conditions of animals Bull. Off. Int. Epizoot. 1963; 59: 1487-9.

Strombeck DR, Guiford WG (1989) Small animal gastroenterology, 2nd edn. Stonegate Publishing. 338-43

Stubbings DP. Clostridium perfringens enterotoxaemia in two young horses. Vet Rec 1990; 127: 431.

Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE (1988) Hagan and Bruners`s microbiology and infectious diseases of domestic animals. Comstock Publishing Associates, Ithaca, N.Y.

Turk J, Fales W, Miller M, Fischer J, Pace L, Johnson GA, Kreeger J, Turnquist

S, Pittman L, Rottinghaus A, al. e. Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). J Am Vet Med Assoc 1992; 200: 991-4.

Unterer S, Strohmeyer K, Sauter-Louis C, Hartmann K. Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clanvulanic acid: a prospective blinded study. J Vet Intern Med 2011; 25: 973-9.

Van der Steen I, Rohde J, Zentek J, Amtsberg G. Dietary effects on the occurrence of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in the intestine of dogs. Kleintierpraxis 1997; 42: 855-936.

Vince A, Dyer NH, O'Grady FW, Dawson AM. Bacteriological studies in Crohn's disease. J Med Microbiol 1972; 5: 219-29.

Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin Microbiol Rev 2005; 18: 247-63.

Weber A, Kroth P, Heil G. The occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of dogs and cats. Zentralbl Veterinarmed B 1989; 36: 568-76.

Weese JS, Staempfli HR, Prescott JF, Kruth SA, Greenwood SJ, Weese HE. The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. J Vet Intern Med 2001; 15: 374-8.

Weese JS, Cote NM, deGannes RV. Evaluation of in vitro properties of di-tri-octahedral smectite on clostridial toxins and growth. Equine Vet J 2003; 35: 638-41.

Weese JS. Antimicrobial resistance: time for action. Vet Rec 2011; 169: 122-3.

Werdeling F, Amtsberg G, Tewes S. Enterotoxin producing strains of *Clostridium perfringens* in faeces of dogs and cats. Münchner Tierärztliche Wochenschrift

1991; 104: 228-33.

Wilcox MH. Cleaning up *Clostridium difficile* infection. *Lancet* 1996; 348: 767-8.

Willis AT (1969) *Clostridia of Wound Infection*. Butterworth, London

Wise MG, Siragusa GR. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 3911-6.

Yoon SS, Brandt LJ. Treatment of refractory/recurrent *C. difficile*-associated disease by donated stool transplanted via colonoscopy: a case series of 12 patients. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 562-6.

## IX. ANHANG

### 1 Anamnesebogen und Untersuchungsbogen

#### 1.1. Anamnesebogen

Anamnese erhoben von: \_\_\_\_\_, Datum: \_\_\_\_\_  
(Tierarzt)

Patient (Label): \_\_\_\_\_

#### 1. Vorbericht:

---

---

---

Aufnahme fremden Materials: ☐ möglich ☐ unwahrscheinlich

was? \_\_\_\_\_

Liegt Schnee? ☐ ja ☐ nein

#### 2. Haltung

Fütterung: was? vom Tisch? \_\_\_\_\_

---

Futterwechsel: \_\_\_\_\_

Fütterungsanamnese der letzten 24 Stunden:

---

---

Hat Hund Schnee gefressen? ☐ ja ☐ nein

#### 3. Allgemeine Gesundheitsvorsorge

Impfung :

Vollständige Grundimmunisierung? (min. 3 x) ☐ ja ☐ nein

Letzte Impfung \_\_\_\_\_(Datum)

Welche Impfung \_\_\_\_\_

**Entwurmung :**

Letzte Entwurmung: \_\_\_\_\_(Datum);

mit \_\_\_\_\_(Präparat)

**Auslandsaufenthalt** oder stammt Tier aus Ausland: ☐ ja ☐ nein,

Land: \_\_\_\_\_

**Erkrankung :**

Medikamente (innerhalb der letzten Woche): \_\_\_\_\_

regelmäßige Medikamentengabe: ☐ ja ☐ nein

Medikament/Dosierung: \_\_\_\_\_

**4. aktueller Gesundheitszustand**

Appetit: ☐ normal ☐ vermindert ☐ vermehrt ☐ siehe Vorbericht

Kotabsatzfrequenz: \_\_\_\_\_(pro Tag) \_\_\_\_\_(letzte 24 Stunden)

Durchfall seit wann: \_\_\_\_\_(Stunden) \_\_\_\_\_(Tage)

Kotqualität: ☐ wässrig ☐ breiig ☐ mit Schleim ☐ Meläna

☐ mit frischem Blut ☐ siehe Vorbericht

Erbrechen: ☐ nein ☐ ja ☐ Regurgitieren

☐ siehe Vorbericht

Erbrechen seit wann: \_\_\_\_\_(Stunden) \_\_\_\_\_(Tage)

Erbrechen wie häufig/Tag: \_\_\_\_\_

Erbrechen Beschaffenheit: ☐ Blutbeimengung ☐ gallig/schaumig

☐ Futter ☐ siehe Vorbericht

Gewichtsverlust in letzten 3 Monaten: \_\_\_\_\_(kg)



**1.2. Untersuchungsprotokoll**

Untersuchung durchgeführt von: \_\_\_\_\_, Datum: \_\_\_\_\_  
(Tierarzt)

Patient (Label):

**Untersuchung**

Ernährungszustand: ☐ physiologisch ☐ adipös ☐ mager

Allgemeinbefinden: ☐ gut ☐ ggr. ☐ mgr.  
☐ hgr. reduziert

Verhalten: ☐ normal ☐ apathisch ☐ stuporös  
☐ hyperaktiv

Körpertemperatur: \_\_\_\_\_ °C

Schleimhäute: ☐ rosa ☐ blass ☐ ikterisch  
☐ zyanotisch ☐ gerötet ☐ feucht  
☐ pappig ☐ trocken

KFZ: ☐ prompt (< 2 s) ☐ verzögert (ca. \_\_\_\_\_ s)

Hautturgor: ☐ physiologisch ☐ Patient \_\_\_\_\_% dehydriert

Herzfrequenz: \_\_\_\_\_ /min Atemfrequenz: \_\_\_\_\_ /min

Abdomenpalpation: ☐ weich ☐ angespannt  
☐ schmerzhaft: \_\_\_\_\_

Rektale Untersuchung: ☐ normal ☐ schmerzhaft  
☐ Hernie ☐ Masse

**2. Endoskopiebericht: Gastrointestinaltrakt**

Datum:

Patientennummer:

Besitzername:

Signalement:

**UNTERSUCHUNG/-EN:****INDIKATION DER UNTERSUCHUNG:**

---

---

**PROBLEME/KOMPLIKATIONEN:**Keine ☐ Perforation ☐ Starke Blutung ☐ Narkosezwischenfall ☐Lange Dauer ☐ Sonstiges ☐Kommentar: 

---

---

☐ Untersuchung unvollständig abgeschlossen      warum:☐ Adequate Biopsieentnahme nicht möglich      warum:☐ Fremdkörperentfernung nicht möglich      warum:☐ Schlechte Visualisierung      warum:**PROBENGEGWINNUNG:**Biopsie ☐ Brush Zytologie ☐ Washing ☐ Aspiration ☐**DOKUMENTATION:**Videos ☐ Bilder ☐☐ **ÖSOPHAGUS**Normal ☐ Fremdkörper ☐ Masse ☐ Striktur ☐ Hiatushernie ☐

Läsion	Code	Kommentar
Hyperämie/Vaskularität		
Verfärbungen		

Verletzbarkeit		
Blutung		
Erosion/Ulzeration		
Inhalt (Schleim, Galle, Futter)		
Erweiterung		
Gastroösophagealer Sphinkter		
Sonstiges		

### ☐ **MAGEN**

Normal ☐    Fremdkörper ☐    Masse ☐    Polyp ☐    Parasiten ☐

Lokalisation der Läsion:

Fundus ☐    Incisura ☐    Antrum ☐    Pylorus ☐

Lokalisation der Biopsien:

Fundus ☐    Incisura ☐    Antrum ☐    Pylorus ☐

Läsion	Code	Kommentar
Inflation unmöglich		
Hyperämie/Vaskularität		
Schleimhautödem		
Verletzbarkeit		
Blutung		
Erosion/Ulzeration		
Inhalt (Schleim, Galle, Futter)		
Passierbarkeit des Pylorus		
Sonstiges		

### ☐ **DUODENUM/JEJUNUM**

Normal ☐    Fremdkörper ☐    Masse ☐    Polyp ☐    Parasiten ☐

Wie weit wurde Endoskop vorgeschoben: \_\_\_\_\_

Wurde Papille/-n gesehen: Ja ☐ Nein ☐

Läsion	Code	Kommentar
Inflation unmöglich		
Hyperämie/Vaskularität		
Schleimhautödem		
Verletzbarkeit		
Texturveränderung		
Blutung		
Erosion/Ulzeration		
Lymphgefäßerweiterung		
Inhalt (Schleim, Galle, Futter)		
Sonstiges		

## ☐ KOLON

Normal ☐ Fremdkörper ☐ Masse ☐ Polyp ☐ Parasiten ☐

Adequate Kolonvorbereitung/Sicht Ja ☐ Nein ☐

Wie weit wurde Endoskop vorgeschoben: \_\_\_\_\_

Wurde Ileozäkalklappe gesehen: Ja ☐ Nein ☐

Läsion	Code	Kommentar
Hyperämie/Vaskularität		
Schleimhautverfärbungen		
Verletzbarkeit		
Texturveränderung		
Blutung		
Erosion/Ulzeration		
Intussusception		
Strikturen		
Sonstiges		

Code:            Normal = 0    Mild = 1            Moderat = 2            Schwer = 3

Kommentar und Empfehlungen:

Name, Unterschrift:

### 3. Protokoll für die histologische Untersuchung

#### Gastrointestinal Histopathology Standards



#### STANDARD FORM FOR ASSESSMENT OF THE GASTRIC BODY OR ANTRAL MUCOSA

Pathologist \_\_\_\_\_ Case number \_\_\_\_\_

Number of pieces of gastric tissue on slide \_\_\_\_\_

Tissue present

☐

Inadequate

☐

Too superficial

☐

Adequate depth

Number of tissues abnormal \_\_\_\_\_

#### MORPHOLOGICAL FEATURES

	Normal	Mild	Moderate	Marked
Surface epithelial injury	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gastric pit epithelial injury	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fibrosis/glandular nesting/ mucosal atrophy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### INFLAMMATION

Intraepithelial lymphocytes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria lymphocytes and plasma cells	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria eosinophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria neutrophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Other inflammatory cells	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gastric lymphofollicular hyperplasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### FINAL DIAGNOSIS

Normal tissue	<input type="checkbox"/>
Lymphoplasmacytic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Eosinophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Neutrophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Mucosal atrophy/fibrosis (non-inflammatory)	<input type="checkbox"/>
Other	<input type="checkbox"/>

#### OTHER COMMENTS



### STANDARD FORM FOR ASSESSMENT OF COLONIC MUCOSA

Pathologist \_\_\_\_\_ Case number \_\_\_\_\_

Number of pieces of colonic tissue on slide \_\_\_\_\_

Tissue present

☐ Inadequate ☐ Too superficial ☐ Adequate depth

Number of colonic tissues abnormal \_\_\_\_\_

#### MORPHOLOGICAL FEATURES

	Normal	Mild	Moderate	Marked
Surface epithelial injury	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crypt hyperplasia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crypt dilation/distortion	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fibrosis/atrophy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### INFLAMMATION

Lamina propria lymphocytes and plasma cells	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria eosinophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria neutrophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria macrophages	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### FINAL DIAGNOSIS

Normal colon	<input type="checkbox"/>
Lymphoplasmacytic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Eosinophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Neutrophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Histiocytic/granulomatous inflammatory	<input type="checkbox"/>
Mucosal atrophy/fibrosis (non-inflammatory)	<input type="checkbox"/>
Other	<input type="checkbox"/>

#### OTHER COMMENTS



### STANDARD FORM FOR ASSESSMENT OF DUODENAL MUCOSA

Pathologist \_\_\_\_\_ Case number \_\_\_\_\_

Number of pieces of duodenal tissue on slide \_\_\_\_\_

Tissue present

☐ Inadequate ☐ Too superficial ☐ Adequate depth

Number of tissues abnormal \_\_\_\_\_

#### MORPHOLOGICAL FEATURES

	Normal	Mild	Moderate	Marked
Villous stunting	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Epithelial injury	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Crypt distension	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lacteal dilation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mucosal fibrosis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### INFLAMMATION

Intraepithelial lymphocytes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria lymphocytes and plasma cells	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria eosinophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lamina propria neutrophils	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Other	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

#### FINAL DIAGNOSIS

Normal tissue	<input type="checkbox"/>
Lymphoplasmacytic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Eosinophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Neutrophilic inflammatory	<input type="checkbox"/>
Lymphangiectasia	<input type="checkbox"/>
Mucosal atrophy/fibrosis (non-inflammatory)	<input type="checkbox"/>
Other	<input type="checkbox"/>

#### OTHER COMMENTS



## **4. Fixationsmedien für Biopsien**

### **4.1. Gepuffertes Paraformaldehyd**

Herstellung des Cacodylatpuffers:

- 10,7 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr.A2140)
- 500 ml Aqua dest.
- 4,15 ml 1 N Salzsäure (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr. A1434)

Einstellen des pH-Wertes mittels 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 109060) oder 0,1 N NaOH (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr. 109141) auf einen Wert von 7,2

- 500 ml Aqua dest. (80 °C)
- 40 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 102382)
- 0,735 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 102382)

Erwärmen auf 70 °C

- 1 N NaOH bis Lösung klar

Abkühlen und Einstellen des pH-Wertes auf 7,2

## **5. Lösungen für die Herstellung der Kunststoffschritte**

### **5.1. Autotechnikonspüllösung für die Kunststoffeinfettung**

Herstellung des 0,1 M Cacodylatpuffers:

- 16,5 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr.A2140)
- 1500 ml Aqua dest.
- 6,23 ml 1 N Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Deutschland Br. 1040)

Einstellen des pH-Wertes auf 7,2

- 105 g Saccharose (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr. A1125)
- 1,105 g Kaliumchlorid-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 1023839)

Einstellen des pH-Wertes auf 7,2

#### **5.1.1. Lösung A**

- 60 ml Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 800588)
- 20 ml Methacrylsäuremethylester (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 8005900)
- 16 ml Ethylenglykolmonobutylether (Serva, Heidelberg, Deutschland Nr. 113102)
- 2 ml Polyethylenglykol 400 (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 817003)
- 338 mg Benzoylperoxid (Fluka, Buchs, Schweiz, Nr. 33581)

#### **5.1.2. Lösung B**

- 40 ml Lösung A
- 60 µl N-N-Dimethylanilin (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 803060)

---

**5.2. Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte****5.2.1. Hämalaun-Eosin-Färbung****5.2.1.1. Eosin-Lösung**

- 1000 ml Aqua dest. Erhitzen
- 10 g Eosin G (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Nr. 7089)
- 1,5 ml 96%-igen Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 100063)

**5.2.1.2. Hämalaun-Lösung**

- Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr. A0884)

**5.2.2. Giemsa-Färbung****5.2.2.1. Giemsa-Gebrauchslösung**

- 97,3 ml Di-Kaliumhydrogenphosphat 13,61 g/l (Applichem, Darmstadt, Deutschland Nr. A3620)
- 2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 14,19 g/l (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 101960)
- 7 ml Giemsa-Stammlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland Nr. 109204)

Einstellen des pH-Wertes auf 5,0

**5.2.2.2. Essigsäure**

- 5 ml Eisessig (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Nr. 3738)
- 1000 ml Aqua dest.

**5.2.3. Lösungen für Immunhistochemie****5.2.3.1. 0,5 M TBS pH 7,6**

- 60,5 g Tris-Hydroxamethylaminomethan (neoLab, Heidelberg, Deutschland Nr. 5675)
- 700 ml Aqua dest.

- 90 g NaCl (neoLab, Heidelberg, Deutschland Nr. 1230)
- 2 N HCl (neoLab, Heidelberg, Deutschland Nr. 5150)

Tris-Hydroxamethylaminomethan in Aqua dest. lösen. Mit 2 N HCl auf pH 7,6 einstellen. Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen und pH-Wert überprüfen. Für Gebrauchslösung mit Aqua dest. auf 1:10 verdünnen und pH-Wert überprüfen.

#### **5.2.3.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1%)**

- 6 ml 30%-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (neoLab, Heidelberg, Deutschland Nr. 1185)
- 180 ml Aqua dest.

#### **5.2.3.3. DAB-Gebrauchslösung**

- 10 mg 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-dihydrat-Tablette (Biotrend Cheminkalien, Köln, Nr. 4170)
- 10 ml Aqua dest.

Im Dunkeln lösen und filtrieren, vor Verwendung zugeben von 1 µl 30%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (neoLab, Heidelberg, Deutschland Nr. 1185) pro 1 ml DAB-Lösung (

## **XI. DANKSAGUNG**

Bei Frau Prof. Katrin Hartmann möchte ich mich herzlich für die Aufnahme in die Klinik und die freundliche Betreuung bedanken.

Vielen Dank an Herrn Prof. Walter Hermanns und die Mitarbeiter des Institutes für Tierpathologie der LMU München, im besonderen Maße an Frau Dr. Miriam Leipzig für die Betreuung im Bereich der Histologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Unterer für die Bereitstellung des Themas, die Hilfe bei der Planung, Organisation und Durchführung der Studie, sowie die stets freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein weiteres Dankeschön an Herrn Dr. Georg Wolf und die Mitarbeiter des Institutes für Bakteriologie und Mykologie für die Hilfe im Bereich der Bakteriologie. Ebenfalls vielen Dank an Herrn PD Dr. Frank Gessler und den Mitarbeitern von miprolab Göttingen für die Typisierung der Clostridien.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Jan Suchodolski und den Mitarbeitern des Gastrointestinal Laboratory der Universität von Texas für die Untersuchung der Kotproben.

Meinen Kollegen und besonders meinen „Mitinterns“ danke ich für die praktische Unterstützung beim Sammeln der Fälle und die Rücksichtnahme in den letzten harten Wochen.

Allen Zwei- und Vierbeinern in meiner Familie möchte ich besonders danken. Ohne deren verlässliche Unterstützung in allen Bereichen, den immer offenen Ohren, dem großen Verständnis für alle meine Klagen und auch der finanziellen Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.